

Charakterisierung der Protein-Protein-Interaktionen von
Septin 7 und DOCK8 in peripheren Blutleukozyten bei
der equinen rezidivierenden Uveitis

von Melanie Schauer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Charakterisierung der Protein-Protein-Interaktionen von
Septin 7 und DOCK8 in peripheren Blutleukozyten bei
der equinen rezidivierenden Uveitis

von Melanie Schauer
aus Berlin

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Univ.-Prof. Dr. C. A. Deeg

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. C. A. Deeg

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hartmut Gerhards

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Meinen Eltern

1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATUR	2
2.1 Equine rezidivierende Uveitis.....	2
2.1.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis	2
2.1.2 Klinisches Erscheinungsbild und Therapie der ERU	3
2.1.3 Ätiologie der ERU	5
2.2. Auge und Immunreaktion	8
2.2.1 Immunsystem und Mechanismen immunologischer Toleranz	8
2.2.2 Autoimmunität.....	10
2.2.3 Das Auge als immunprivilegiertes Organ.....	12
2.3. Immunologie von Uveitiden	13
2.3.1 Autoimmune Uveitis des Menschen	13
2.3.2 Experimentell induzierbare autoimmune Uveitis.....	14
2.3.3 ERU als spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis.....	15
2.4 Proteomik	17
2.4.1 Protein-Protein-Interaktionen.....	17
2.4.2 Quantitative Proteinanalyse	20
2.5 Septin 7 als differentiell exprimiertes Protein bei der ERU	21
3 MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1 Probenmaterial.....	24
3.1.1 Puffer und Lösungen zur Gewinnung und Aufbereitung von PBL	26
3.1.2 Gewinnung der Blutproben	28
3.1.3 Gewinnung von peripheren Blutleukozyten (PBL) mittels Dichtegradientenzentrifugation	28
3.1.4 Zählung der gewonnenen Zellen	29
3.1.5 Aufbewahrung von lebenden PBL	29
3.1.6 Aufbereitung der PBL für Western Blots	30
3.1.7 Aufbereitung der PBL für die Immunpräzipitation	30

3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate	31
3.2.1 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung	31
3.2.2 Durchführung der Proteinbestimmung	32
3.3 Immunpräzipitation.....	33
3.3.1 Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation	33
3.3.2 Antikörper für die Immunpräzipitation	34
3.3.3 Durchführung der Immunpräzipitation	34
3.4 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen	37
3.4.1 FASP-Verdau der Immunpräzipitate	37
3.4.2 LC-MS/MS	40
3.4.2 Quantitative Auswertung mit Progenesis	42
3.4.3 Datenbanksuche für die mittels LC-MS/MS identifizierten Peptide.....	43
3.4.5 Suche und funktionelle Analyse von Orthologen und Paralogen.....	44
3.4.6 Auswertung der Proteinabundanzen	45
3.4.7 Einteilung der massenspektrometrisch identifizierten Protein in funktionelle Gruppen	45
3.5 Durchflusszytometrie	46
3.5.1 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	46
3.5.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie	47
3.5.3 Fluoreszenzfärbung von equinen PBL für die Durchflusszytometrie	48
3.5.4 Detektion gefärbter Zellen mit dem Durchflusszytometer	50
3.5.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	51
3.5.6 Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	52
3.6 Immunzytochemie	53
3.6.1 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie	53
3.6.2 Antikörper für die Immunzytochemie	54
3.6.3 Immunzytochemische Färbung.....	54

3.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
3.7.1 Puffer und Lösungen	56
3.7.2 Durchführung der 1D Gelelektrophorese	61
3.7.3 Durchführung des Western Blot	62
3.7.4 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung	62
3.7.5 Immunoblot	63
3.7.5 Statistische Auswertung	65
4 ERGEBNISSE	66
4.1 Identifikation von Hematopoietic cell specific Lyn substrate 1 und Dedicator of cytokinesis 8 als potenzielle Septin 7-Interaktoren	66
4.1.1 Charakterisierung des Interaktorproteins HCLS1 in equinen PBL	68
4.1.2 Charakterisierung des Interaktionspartners DOCK8	76
4.2 Identifikation potentieller DOCK8-Interaktoren mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie	86
4.3 Massenspektrometrische Identifikation von interagierenden Signaltransduktionsmolekülen bei gesunden und an ERU erkrankten Pferden	90
4.3.1 Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 und Signaltransduktionsmolekülen bei gesunden und an ERU erkrankten Pferden	91
4.3.2 Protein-Protein-Interaktionen von DOCK8 mit Signaltransduktionsmolekülen bei gesunden und an ERU erkrankten Pferden	95
4.4 Verifikation der Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 und DOCK8	100
4.4.1 Verifizierte Interaktion zwischen Septin 7 und den Signaltransduktionsmolekülen STAT1 und ILK	101
4.4.2 Verifizierte Interaktion zwischen DOCK8 und den Signaltransduktionsmolekülen STAT1 und ILK	102
4.5 Untersuchungen zu den Interaktionspartnern STAT1 und ILK	103
4.5.1 Phänotypisierung von STAT1 in Pferdelymphozyten	103
4.5.2 Vergleichbare STAT1-Abundanz in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde	106

4.5.3 Differentielle Expression von phosphoryliertem STAT1 in den Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden.....	107
4.5.4 Differentielle Expression von ILK in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden.....	108
5 DISKUSSION	109
6 ZUSAMMENFASSUNG	133
7 SUMMARY	135
8 LITERATURVERZEICHNIS	137
DANKSAGUNG	162

Abkürzungsverzeichnis

α	Anti
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
1D	Eindimensional
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
Breg	Regulatorische B-Zelle
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Erkennungsmolekül an der Oberfläche von Zellen (<i>engl.</i> Cluster of Differentiation)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cpm	Einheit für die [3H]-Aktivität (<i>engl.</i> counts per minute)
CRALBP	Cellular Retinaldehyde-binding Protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DZ	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Deoxyribonucleic acid)
DOCK8	Dedicator of Cytokinesis 8
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced-Chemilumineszenz
Engl.	Englisch
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl.</i> Fluorescence activated cell sorting)
FASP	Art der Proteinaufbereitung für die Massenspektrometrie (<i>engl.</i> Filter-aided sample preparation)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>engl.</i> Fetal calf serum)

Abkürzungsverzeichnis

FDR	Falschpositivrate (<i>engl.</i> False discovery rate)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluo-Puffer	Fluoreszenzpuffer
geo MFI	Bindungsintensität (<i>engl.</i> geometric Mean fluorescence intensity)
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAU	Humane autoimmune Uveitis
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl.</i> High-performance liquid chromatography)
HCLS1	Hematopoietic Lineage Cell-Specific Protein 1
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL	Interleukin
ILK	Integrin-linked Kinase
IP	Immunpräzipitation
IPP	ILK-PINCH-Parvin
IRBP	Interphotoreceptor retinoid binding protein
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LC	Flüssigchromatografie (<i>engl.</i> Liquid chromatography)
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm

Abkürzungsverzeichnis

mgf	Dateiformat (<i>engl.</i> Mascot generic file)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> Major histocompatibility complex)
MIC	Minimale Hemmkonzentration (<i>engl.</i> minimal inhibitory concentration)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millilolar
MS	Massenspektrometrie
MS	Multiple Sklerose
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTEC	Medulläre epitheliale Thymuszellen
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
p	Signifikanzwert (<i>engl.</i> probability-value)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS-Tween Lösung
POD	Peroxidase
PPI	Protein-Protein-Interaktionen
PTA	Periphery tissue antigen
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP(-T)	Polyvinylpyrrolidone (-Tween) Lösung
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>engl.</i> Relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> Ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
S-Ag	S-Antigen
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate)

Abkürzungsverzeichnis

sec	Sekunden
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
Tab.	Tabelle
T-bet	Th1-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor (<i>engl.</i> T-box transcription factor TBX21)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Tris-buffered saline)
tDZ	Tolerogene dendritische Zellen
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> Transforming growth factor beta)
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>engl.</i> Toll-like receptor)
Treg	Regulatorische T-Zelle
WHO	World Health Organization

1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitits (ERU) ist eine durch wiederkehrende Entzündungsschübe gekennzeichnete Augenerkrankung des Pferdes, die mit einer hohen Prävalenz von etwa 10 % auftritt (Spiess, 2010). Sie ist weltweit die häufigste Ursache für die Erblindung des Pferdes und geht mit erheblichen wirtschaftlichen und ideellen Verlusten einher (Gilger and Michau, 2004, Schwink, 1992).

Die Ätiologie der ERU ist bislang ungeklärt, jedoch wurde in unterschiedlichen Studien gezeigt, dass es sich um eine immunmedierte Erkrankung handelt, bei der autoreaktive T-Zellen die Blut-Retina-Schranke passieren und intraokulare Strukturen infiltrieren (Deeg et al., 2006b). Eine mögliche Ursache für die Einwanderung autoreaktiver Lymphozyten ist eine Änderung ihres Proteinexpressionsmusters (Degroote et al., 2014).

Bisherige vergleichende proteomische Analysen des Lymphozytenproteoms gesunder und an ERU erkrankter Pferde zeigten Pathogenese-assoziierte Expressionsänderungen unterschiedlicher Proteine (Degroote et al., 2014, Degroote et al., 2017). Bei einem dieser differentiell exprimierten Proteine, der zytoskelettalen GTPase Septin 7, wurde eine signifikante Expressionsminderung in den Lymphozyten an ERU erkrankter Pferde festgestellt (Degroote et al., 2014). Septin 7 gehört zur Familie der Septine, die an zahlreichen zellulären Funktionen, wie Apoptose, Zellteilung und Organisation des Zytoskeletts, beteiligt sind (Abbey et al., 2016). Die Auswirkungen einer differentiellen Expression von Septinen wurden aufgrund vermehrter Assoziationen mit neurodegenerativen Erkrankungen und Krebserkrankungen eingehend untersucht (Rozenkrantz et al., 2016, Zhang et al., 2016), aber bisher nicht in Autoimmunerkrankungen.

Da Septin 7 auch in der Pathogenese der ERU eine potentielle Schlüsselrolle einnimmt, könnte die funktionelle Charakterisierung des Proteins im Rahmen dieser Autoimmunerkrankung neue Hinweise für die Aufklärung Pathogenese-assoziiierter Mechanismen liefern. Die Funktionen von Proteinen wie Septin 7 hängen entscheidend von den Interaktionsnetzwerken ab, in denen sie agieren (Wasik et al., 2017). Um mehr über die Rolle von Septin 7 im Verlauf der ERU zu erfahren, ist es das Ziel dieser Arbeit, Septin 7-Interaktoren in equinen Blutleukozyten zu identifizieren und in weiteren Expressionsanalysen zu charakterisieren.

2 LITERATUR

2.1 Equine rezidivierende Uveitis

2.1.1 Definition und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis

Die Uveitis wird als eine Entzündung der mittleren Augenhaut, der Uvea, definiert. Sie betrifft damit die stark vaskularisierten Strukturen des Augeninnern, die Choroidea, den Ziliarkörper und die Iris (Wang et al., 2016b). Bei einer Beteiligung der Retina spricht man von einer Uveoretinitis. Die Uveitis kann nach den Richtlinien der International Uveitis Study Group (IUSG) je nach anatomischer Lokalisation in eine anteriore, intermediäre, posteriore Uveitis oder Panuveitis unterteilt werden (Bloch-Michel and Nussenblatt, 1987). Die durch wiederkehrende Entzündungsschübe des Pferdeauges gekennzeichnete equine rezidivierende Uveitis (ERU) tritt spontan mit einer hohen Prävalenz von etwa 10% in der europäischen Pferdepopulation (Spiess, 2010) und bis zu 25% in den USA (Gilger, 2010) auf. Rasseabhängig können Unterschiede verzeichnet werden. Besonders häufig von der ERU betroffen sind unter anderem Appaloosas und deutsche Warmblutpferde. Eine genetische Prädisposition konnte bei diesen Rassen nachgewiesen werden (Fritz et al., 2014, Kulbrock et al., 2013, Deeg et al., 2004a). Sie betrifft Pferde jeden Alters und stellt weltweit die häufigste Ursache für die Erblindung beim Pferd dar (Gilger and Michau, 2004, Schwink, 1992, Rebhun, 1979). Das Pferd gehört zu den Fluchttieren und reagiert bei dem Verlust der Sehfähigkeit mit unvorhersehbarem Verhalten. Bei der vollständigen Erblindung des Pferdes ist eine Euthanasie aus tierschutzrechtlichen und sicherheitsrelevanten Gründen unerlässlich (Gerding and Gilger, 2016, Degroote et al., 2014). Damit geht die Erkrankung mit erheblichen wirtschaftlichen und ideellen Verlusten einher und es bedarf weiterer Aufklärungsarbeit zur langfristigen Prävention und erfolgreichen kausalen Therapie der ERU.

2.1.2 Klinisches Erscheinungsbild und Therapie der ERU

Die Symptomatik der equinen rezidivierenden Uveitis äußert sich vielfältig. Durch den rezidivierenden Verlauf wechseln sich Phasen der akuten Entzündung mit symptomlosen Phasen ab (Gilger and Michau, 2004). Charakteristisch ist ein progressiver Verlauf, bei dem sich die entzündungsfreien Intervalle verkürzen, wohingegen die Häufigkeit der akuten Phasen steigt (Rebhun, 1979, Schwink, 1992). Die Entzündungsschübe selbst zeichnen sich durch variierende Schweregrade aus. Je nach anatomischer Lokalisation äußern sich die Symptome klinisch unauffällig bis hin zu einer hohen Schmerzhaftigkeit (Spiess, 1997, Schwink, 1992). Bei einer Beteiligung des Ziliarkörpers und der Iris können bei der ERU klassisch auftretende Symptome wie Miosis, Photophobie, Epiphora und Blepharospasmus des betroffenen Auges beobachtet werden (Schwink, 1992). Es treten diffuse Hornhautödeme und stark gerötete Konjunktiven auf. Des Weiteren können ventral im vorderen Augensegment Exsudatansammlungen in Form eines Hyphämas oder Hypopyons auftreten (Rebhun, 1979, Schwink, 1992, Spiess, 1997). Nach dem Abklingen der Symptome können Spätfolgen in Form zerstörter Augenstrukturen beobachtet werden. Neben fokalen Katarakten treten auch Synechien auf, die im weiteren Verlauf durch die bindegewebige Fixierung nur noch unter Substanzverlust gelöst werden können (Gilger et al., 1999). Die Entzündung des hinteren Augensegments geht zunächst mit unauffälligen Symptomen einher, äußert sich im weiteren Verlauf aber dramatisch. Es kommt vorerst nur zu einer geringen bis vollständig ausbleibenden Schmerzäußerung (Gilger and Michau, 2004). Als Spätfolge kann es jedoch zu peripapillären Netzhautnarben und einer daraus resultierenden Netzhautablösung kommen (Strobel et al., 2007). Schließlich führen die wiederkehrenden Entzündungsschübe zu irreversiblen Schädigungen der Augenstrukturen, einer Verkleinerung des Bulbus (Phtisis bulbi) und der damit einhergehenden Erblindung des Auges (Deeg et al., 2002a, Gilger et al., 1999). Die konservative Therapie der Erkrankung strebt eine antiinflammatorische, analgetische Wirkung an. Zum Einsatz kommen daher zunächst lokale Kortikosteroide und systemische nichtsteroidale Antiphlogistika (Gilger and Michau, 2004). Die Anwendung von Mydriatika und Zykloplegika kann die Schmerzhaftigkeit verringern und einer hinteren Synechie vorbeugen (Gerding and Gilger, 2016, Gilger and Michau, 2004). Zum Einsatz von systemischen Antiinfektiva zur Behandlung einer

equinen rezidivierenden Uveitis sind bisher nur wenige Studien veröffentlicht worden. Die kontrovers diskutierte Hypothese, dass es sich bei der ERU um eine durch Leptospiren ausgelöste Erkrankung handelt, war Anlass für Untersuchungen intraokularer Wirkstoffkonzentrationen nach systemischer Antibiotikagabe (Divers et al., 2008). In unterschiedlichen Studien wurde die Anwendung von Fluorchinolonen wie Enrofloxazin (Divers et al., 2008) beziehungsweise Tetracyklinen wie Doxycyclin oder Minocyclin (Schnabel et al., 2012, Gilmour et al., 2005) getestet. Eine bedeutende Fragestellung in bisherigen Studien war die Untersuchung der intraokularen Wirkstoffkonzentration nach systemischer Antibiotikaapplikation (Divers et al., 2008). Für eine optimale Bioverfügbarkeit sollte der angewandte Wirkstoff die Blut-Retina-Schranke überwinden und in einer ausreichenden Konzentration im Glaskörper vorliegen, die über die MIC der Leptospiren hinausgeht (Divers et al., 2008). Bei systemisch angewandten Antiinfektiva wie Doxycyclin und Monocyclin gelang es nicht, einen ausreichenden intraokularen Wirkstoffspiegel zu erreichen, der für die erfolgreiche Elimination der Erreger notwendig gewesen wäre (Gilmour et al., 2005, Schnabel et al., 2012). Als Gründe wurden die nicht ausreichende Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes und eine nicht erfolgte Penetration der Blut-Retina-Schranke vermutet (Gilmour et al., 2005). Nach intravenöser Gabe von Enrofloxazin konnte in einer Studie jedoch gezeigt werden, dass eine Wirkstoffkonzentration im Glaskörper messbar war, die über der MIC der Leptospiren lag (Divers et al., 2008). Insgesamt sechs gesunden Pferden wurde für diese Untersuchung viermalig Enrofloxazin (Baytril 100) in der Konzentration 7,5 mg/kg verabreicht und die Konzentration des Wirkstoffs an Tag 3 und Tag 4 im Plasma und im Glaskörper gemessen. Zusätzlich wurde in jeweils einem Auge an zwei Tagen eine Parazentese durchgeführt, um eine Störung der Blut-Retina-Schranke zu simulieren. Diese Störung war nur geringgradig im Vergleich zu dem im Verlauf der ERU auftretenden Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke. Dennoch konnte eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Augeninneren gemessen werden (Divers et al., 2008). Trotz dieser Studie wird die Anwendung von Enrofloxazin als Standardbehandlung bei an ERU erkrankten Pferden nicht empfohlen (Divers et al., 2008). Als Grund hierfür wird aufgeführt, dass in den USA ein gehäuftes Auftreten von equiner rezidivierender Uveitis ohne eine Beteiligung von Leptospiren beschrieben wurde (Gilger et al., 2008) und eine Assoziation somit nicht bewiesen ist (Divers et al., 2008). Zusätzlich konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigen, dass die

Anwendung von Antiinfektiva nur eine minimale Wirkung auf die Erhaltung der Sehfähigkeit bei an einer Uveitis erkrankten Pferden hat (Gerding and Gilger, 2016). Die Tatsache, dass die zur Behandlung ausgewählten Antibiotika von der World Health Organisation (WHO) als Reserveantibiotika für die Anwendung in der Humanmedizin klassifiziert wurden (Gerding and Gilger, 2016), stellt neben dem nicht erwiesenen Therapieerfolg eine bedeutende Kontraindikation bei der Behandlung der ERU dar. Bei schweren Verläufen mit häufig wiederkehrenden Entzündungsschüben hat sich der Einsatz von suprachoroidalen Ciclosporin A Implantaten bewährt (Gilger et al., 2010). Ciclosporin A wirkt immunsuppressiv durch die Hemmung der T-Zellproliferation und Zytokinproduktion (Schewitz-Bowers et al., 2015). Die Erhaltung der Sehfähigkeit bei etwa 70 % der behandelten Pferde über einen Zeitraum von 5 Jahren nach der Behandlung macht diese Methode zu einer erfolgreichen Therapie (Gilger et al., 2010). Während diese Methode vorrangig in den USA Anwendung findet, hat sich in Europa, vorrangig in Deutschland eine operative Behandlung bei schweren Krankheitsverläufen etabliert (Spiess, 2010). Mit der Einführung dieser Methode, der Pars plana Vitrektomie beim Pferd, war es möglich die Entzündungsprodukte und -mediatoren gezielt mit dem getrübten Glaskörper zu entfernen und eine Abnahme der entzündlichen Aktivität im Auge zu induzieren (Werry and Gerhards, 1992). Durch diese Behandlung wurde in vielen Fällen die Rezidivrate gesenkt und die Erhaltung der Sehfähigkeit gewährleistet (Fruhauf et al., 1998, Werry and Gerhards, 1992). Dennoch kommt es bei dieser Therapie zu Komplikationen, wie intraokulare Hämorrhagien und schwere traumatisch bedingte Katarakt (Fruhauf et al., 1998). Des Weiteren kann es im späteren Verlauf postoperativ zum vollständigen Visusverlust des operierten Auges kommen (von Borstel et al., 2005).

2.1.3 Ätiologie der ERU

Die Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis bleibt bislang ungeklärt (Degroote et al., 2017, Gerding and Gilger, 2016). Jedoch wurde in den letzten Jahren klar, dass es sich bei der equinen rezidivierenden Uveitis um eine immunmedierte Erkrankung handelt (Deeg et al., 2002a, Deeg et al., 2006b, Deeg et al., 2004b). Vor allem die wiederkehrenden Inflammationen, der erfolgreiche Einsatz von Ciclosporin A und Kortikosteroiden und der ausbleibende Therapieerfolg bei Antibiotikagabe

sprachen für ein immunmediertes Geschehen (Romeike et al., 1998, Gilger et al., 2000). Zusätzlich wurde diese Tatsache durch die Immunreaktion autoreaktiver T-Zellen gegen die retinalen Autoantigene Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP), S-Antigen (S-Ag) (Deeg et al., 2001) und das zelluläre Retinin-Aldehyd-bindende Protein (CRALBP) (Deeg et al., 2006b) belegt. Es konnte gezeigt werden, dass diese autoreaktiven T-Lymphozyten in der Peripherie aktiviert werden, die Blut-Retina-Schranke passieren und intraokulare Strukturen wie den Ziliarkörper, die Choroidea und die Retina infiltrieren (Deeg et al., 2002a, Gilger et al., 1999). Im Rahmen immunhistologischer Untersuchungen von Augen an ERU erkrankter Pferde konnten zudem Lymphfollikelaggregate detektiert werden, die vorrangig im Stroma der Iris, der Ora serrata und im Ziliarkörper lokalisiert waren (Kleinwort et al., 2016, Deeg et al., 2002b). Die Charakterisierung der Zellen innerhalb der Lymphfollikelaggregate identifizierte T-Zellen, hauptsächlich CD4⁺-T-Helferzellen (Th), als vorherrschenden Zelltyp (Kleinwort et al., 2016, Deeg et al., 2002b). Th-Zellen können sich nach ihrer Aktivierung zu unterschiedlichen Effektorzellen differenzieren. Beim Pferd wurde bisher eine Differenzierung zu Th1-, Th2-, Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg) festgestellt (Wagner et al., 2010, Regan et al., 2012). Welche Th-Zellantwort bei der ERU vorrangig beteiligt ist, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Jedoch konnten bisherige Untersuchungen bestätigen, dass sowohl Th1-Zellen als auch Th17-Zellen in intraokularen Zellinfiltraten vertreten waren (Gilger et al., 1999, Regan et al., 2012). Durch die Detektion einer erhöhten Interferon γ (IFN γ)- und Interleukin (IL)-2-Produktion konnte die ERU zunächst als eine T-Zell-medierte Erkrankung mit vorherrschender Th1-Immunantwort charakterisiert werden (Gilger et al., 1999). Auch der Nachweis einer erhöhten Expression von IFN γ in retinalen Müller-Glia-Zellen bei an ERU erkrankten Pferden bestätigte das Vorliegen eines Th1-medierten Geschehens (Hauck et al., 2007). Weitere Untersuchungen des Zytokinprofils in den Augen von an ERU erkrankten Pferden konnten neben dem Nachweis einer Th1-Immunantwort die Beteiligung von Th17-Zellen belegen (Regan et al., 2012, Simeonova et al., 2016). Auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass entweder die Th1- oder die Th17-Immunantwort unabhängig voneinander im Verlauf der experimentell induzierbaren autoimmunen Uveitis (EAU) eine Rolle spielen kann (Luger et al., 2008). Durch IFN γ -Knock-Out-Mäuse, bei denen eine Uveitis durch die Injektion von IRBP induziert wurde, konnte gezeigt werden, dass

die Th17-Immunantwort ohne eine Beteiligung der Th1-Effektorzellen ausgelöst wird (Luger et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch eine Th1-Immunantwort ohne die Beteiligung von Th17-Effektorzellen eine Uveitis induzierte (Luger et al., 2008). Aus diesem Befund wurde postuliert, dass die Th17-Immunantwort gegenüber der Th1-Immunantwort in der Pathogenese der EAU nicht zwangsläufig eine Schlüsselrolle einnimmt (Luger et al., 2008). Das von Th17-Zellen produzierte Zytokin IL-17 wirkt im Mausmodell pro-inflammatorisch, indem es unter anderem die lokale Produktion von Chemokinen sowie die Rekrutierung von Monozyten und Granulozyten initiiert. Dieser proinflammatorische Effekt des Zytokins konnte auch im Rahmen der EAU im Mausmodell nachgewiesen werden (Peng et al., 2007). IRBP-spezifische IL-17⁺CD4⁺- T-Zellen und IL-17⁺CD8⁺-T-Zellen (Peng et al., 2007), die *in vitro* mit IL-23 stimuliert wurden, wurden in ein naives Empfängertier injiziert und lösten dort eine EAU aus (Peng et al., 2007). Allerdings konnte sowohl bei Lewis-Ratten als auch im Mausmodell auch ein protektiver Effekt des Zytokins gegen eine experimentell induzierte Uveitis gezeigt werden (Ke et al., 2009). Lewis-Ratten und B10RIII-Mäusen wurden im Laufe einer durch adoptiven Transfer induzierten EAU über mehrere Tage hinweg IL-17 Injektionen verabreicht, woraufhin ein Rückgang der autoreaktiven Immunantwort beobachtet wurde (Ke et al., 2009). Das Prinzip dieser gegensätzlichen, protektiven Funktion wurde mit der Bystander-Aktivität von Th17-Zellen erklärt (Nian et al., 2012). Mit IRBP immunisierte Mäuse wurden T-Zellen aus Milz und Lymphknoten entnommen, die mit Antigen-präsentierenden Milzzellen unter Th17-Zell-polarisierenden Bedingungen kultiviert wurden (Nian et al., 2012). Diese zu Th17-Zellen differenzierten T-Zellen wurden in ein naives Empfängertier injiziert und induzierten eine EAU (Nian et al., 2012). Es konnten neben den uveitogen wirkenden IL-17⁺ Th17- Zellen auch Bystander-IL-17⁺ Th17-Zellen identifiziert werden, die auf das retinale Autoantigen IRBP nicht reagierten (Nian et al., 2012). Die Mausmodelle können nur bedingt zur Aufklärung der Pathogenese der ERU beitragen, da die Komplexität der spontanen Erkrankung durch die EAU-Forschung nicht vollständig repräsentiert werden kann.

2.2. Auge und Immunreaktion

2.2.1 Immunsystem und Mechanismen immunologischer Toleranz

Das Immunsystem schützt den Körper vor schädlichen Einflüssen, wie Infektionserregern, Toxinen und degenerierten Zellen (Soares et al., 2017). Dabei greift es auf zwei essentielle Mechanismen zurück, auf die angeborene und die erworbene Immunabwehr (Coughlin et al., 2016). Ursprünglich erfolgte eine strikte Trennung beider Formen. Jedoch stellte sich in den letzten Jahren heraus, dass angeborenes und erworbenes Immunsystem funktionell ineinander greifen und miteinander interagieren (Wu and Chen, 2016, Newson et al., 2014). Die angeborene Immunabwehr hat von Geburt an die Aufgabe, eingedrungene Erreger durch die Aktivierung des Komplementsystems sowie durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen unmittelbar zu bekämpfen (Kouwaki et al., 2016, Mortensen et al., 2017, Iwasaki and Medzhitov, 2015). Das erworbene Immunsystem entwickelt sich erst langsam nach der Geburt und steigert seine Effektivität über das gesamte Leben. Die wichtigsten Komponenten des erworbenen Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten (Coughlin et al., 2016). Damit sind gerade diese Zellen für die Erforschung sämtlicher Immunmechanismen äußerst interessant (Mangino et al., 2017). Die Induktion der erworbenen Immunantwort erfolgt durch den Zell-Zell-Kontakt Antigen-präsentierender dendritischer Zellen (DZ) mit naiven T-Zellen (Moura Rosa et al., 2016). Durch Studien konnte gezeigt werden, dass reife DZ über einen längeren Zeitraum in der Lage waren, stabile Zell-Zell-Kontakte mit naiven CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen zu initiieren (Benvenuti et al., 2004, Hugues et al., 2004). CD4⁺-T-Zellen können sich nach ihrer Aktivierung zu unterschiedlichen T-Helfer-Zellpopulationen differenzieren. In Abhängigkeit ihres Zytokinmilieus erfolgt bei Maus und Mensch eine Differenzierung zu Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, Th22- oder regulatorischen T Zellen (Treg) (Gorenc et al., 2016, Schmidt et al., 2016). Den unterschiedlichen Effektorzellen ist ein charakteristisches Zytokinprofil zugeordnet. Während Th1-Zellen vorrangig IL-2 und IFN γ produzieren (Zytokine, die an autoimmunen Prozessen beteiligt sind), sekretieren Th2-Effektorzellen unter anderem IL-4 (Lu et al., 2016), das vor allem bei allergischen Reaktionen, wie Asthmaerkrankungen und allergischer Rhinitis des Menschen, vermehrt produziert

wird (Seumois et al., 2016). Die Th17-Immunantwort, die bei der Maus mit einer Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-26 und IL-22 einhergeht (Ronchi et al., 2016, Coutaz et al., 2016), ist wie auch die Th1-Immunantwort an unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen wie der multiplen Sklerose (MS) (Alvarenga-Filho et al., 2017) oder Morbus Behçet (Emmi et al., 2016) beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen wirkt sich die Induktion der T-Zellantwort nicht schädigend auf körpereigene Strukturen aus (Thompson et al., 2016). Dieser Mechanismus, die immunologische Toleranz, wird durch Treg induziert und über zahlreiche Faktoren reguliert (Malhotra et al., 2016, Cruz et al., 2017). Es wird zwischen einer zentralen Toleranz, die im Thymus induziert wird, und einer peripheren Toleranz differenziert (Griesemer et al., 2010). Unter der zentralen Toleranz versteht man die Kontrolle der Rezeptorspezifitäten bei der Lymphozytenreifung (Malhotra et al., 2016). Bei der Induktion der zentralen Toleranz spielen Antigen-präsentierende Zellen, nämlich medulläre epitheliale Thymuszellen (mTEC) und dendritische Thymuszellen, die Hauptrolle (Ustarroz-Cano et al., 2017, Mouri et al., 2014). Durch das funktionelle Zusammenspiel dieser Zellen im Thymus wird die T-Zellantwort durch die Elimination autoreaktiver T-Zellen und durch die Produktion regulatorischer T-Zellen (Treg) reguliert (Herbin et al., 2016). Diese CD4⁺CD25⁺-Treg inhibieren die Funktionen autoaggressiver T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass ein funktioneller Defekt bei regulatorischen T-Zellen Auswirkungen auf die Erhaltung der immunologischen Toleranz hat (Mukhopadhyay et al., 2016, Cruz et al., 2017). Die Präsentation des Antigens in epithelialen Thymuszellen spielt sowohl für die zentrale, als auch für die periphere immunologische Toleranz eine bedeutende Rolle. Im Thymus werden Thymozyten durch mTEC Antigene präsentiert (Wang et al., 2016a). Dieser Prozess ist von der Aire (Autoimmun-Regulator)-regulierten Expression peripherer Gewebsantigene (periphery tissue antigens (PTA)) auf mTEC abhängig (Meredith et al., 2015). Über Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complex* (MHC)) werden Autoantigene auf der Zelloberfläche präsentiert und daran bindende Thymozyten anhand ihrer Bindungsaffinität selektiert (Malhotra et al., 2016). Thymozyten mit einer sehr starken Bindungsaffinität zu den MHCII Molekülen oder solche, die nur eine sehr schwache Affinität aufweisen, lösen eine negative Selektion mit nachfolgender Apoptose aus (Malhotra et al., 2016). Die Thymozyten, die durch den Kontakt mit mTEC nicht entfernt werden, gelangen in die Peripherie und reifen zu T-Lymphozyten aus (Xing et al., 2016). In der Peripherie werden

weitere Mechanismen in Gang gesetzt, um die körpereigenen Strukturen vor der Autoaggressivität reaktiver T-Zellen zu schützen und damit einhergehende Autoimmunreaktionen zu verhindern. Zum einen erfolgt eine Elimination autoreaktiver T-Zellen durch intrinsische Signale, wie beispielsweise die klonale Deletion (Hirai et al., 2016). Außerdem kann die immunologische Toleranz in der Peripherie durch tolerogene dendritische Zellen (tDC) induziert werden. Diese Zellen kontrollieren die durch reaktive T-Zellen ausgelöste Autoaggressivität, indem sie die Unempfindlichkeit von T-Zellen Antigenen gegenüber steigern und die Produktion regulatorischer T-Zellen induzieren (Adnan et al., 2016). Das Zusammenspiel zentraler und peripherer immunologischer Toleranz ist für die Erhaltung von körpereigenen Strukturen von erheblicher Bedeutung.

2.2.2 Autoimmunität

Bei der Autoimmunität sind die Mechanismen der Immuntoleranz gestört und es kommt zur Immunreaktion gegen körpereigene Strukturen. Weltweit sind etwa 7,6 - 9,4 % der Menschen von einer Autoimmunerkrankung betroffen (Cooper et al., 2009). Durch die steigende Prävalenz und die teilweise schweren Krankheitsverläufe, die zu einer hohen Morbidität führen, gewinnen Autoimmunerkrankungen in den letzten Jahren an Bedeutung (Liang et al., 2017b). Dabei kann ein bestimmtes Organ betroffen sein (organspezifische Autoimmunerkrankung) oder das gesamte System (systemische Autoimmunerkrankung), wobei Überschneidungen in der Symptomatik auftreten können (Koszarny et al., 2015). In den meisten Fällen ist die Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen ungeklärt und die Therapie richtet sich unspezifisch gegen die Symptomatik. Bei einer Dämpfung der Immunreaktion durch die dauerhafte Anwendung immunsuppressiv wirkender Medikamente kommt es zu erheblichen Nebenwirkungen und Einschränkungen (Lizotti Ciliao et al., 2016, Fujio et al., 2016). Daher ist es von Bedeutung, die Pathomechanismen der Autoimmunerkrankungen näher zu untersuchen und präventive Maßnahmen sowie kausale Therapien zu entwickeln (Liang et al., 2017b). Bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen werden zahlreiche initiierende Faktoren vermutet. In den meisten Fällen liegt eine genetische Prädisposition vor, die in einem Zusammenspiel mit zusätzlichen äußeren Einflüssen als Auslöser in Betracht gezogen wird. Solche

extrinsischen Faktoren, wie beispielsweise virale oder bakterielle Infektionen, sind in der Lage durch molekulare Mimikry und Bystander-Effekte eine autoreaktive T-Zell-Antwort zu induzieren (Sanderson et al., 2017). Die molekulare Mimikry beruht auf dem Phänomen, dass durch körpereigene Strukturen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Strukturen in Mikroorganismen eine autoreaktive T-Zell Antwort ausgelöst wird (Oldstone, 1998). Es entsteht eine Kreuzreaktion zwischen einem Mikroorganismus und einem Autoantigen, die zu einer Autoimmunitätsreaktion führen kann (Chodisetti et al., 2012). Diese T-Zell-Aktivierung wird auch nach der Elimination des Erregers durch Autoantigene aufrechterhalten (Oldstone, 1987). Die Bystander-Aktivierung hingegen beschreibt einen Prozess, bei dem es durch die primäre Immunantwort auf körperfremde Antigene zur Schädigung körpereigener Strukturen und einer damit einhergehenden Autoimmunreaktion kommt (Moore and Adler, 2016). Die zerstörten Zellen exponieren körpereigene Antigene, die eine autoreaktive T-Zell-Antwort induzieren (Moore and Adler, 2016). Während der Immunantwort kann es zu einem Wechsel der Immunspezifität von T-Lymphozyten kommen. Als Folge richtet sich die Autoreaktivität der reaktiven T-Zellen nicht mehr gegen das ursprüngliche Epitop des Autoantigens, sondern gegen ein anderes Epitop (Vanderlugt and Miller, 1996). Diese Ausbreitung der Autoreaktivität wird als Epitop Spreading bezeichnet und dient als Erklärung für die wiederkehrenden Inflammationen während einer Autoimmunerkrankung. Bei Erkrankungen wie Multipler Sklerose (Quintana et al., 2014), Pemphigus (Hayakawa et al., 2016) und experimentell induzierter Uveitis (EAU) (Boldison et al., 2015) wird das Epitop Spreading als Ursache für die chronisch rezidivierenden Krankheitsverläufe diskutiert. Zudem könnte das Epitop Spreading auch eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der ERU einnehmen. In einer Langzeitstudie gelang der Nachweis von inter- und intramolekularem Spreading bei an ERU erkrankten Pferden (Deeg et al., 2006a). Sowohl die Verschiebung der Reaktivität von T-Zellen gegen S-Antigen auf IRBP (intermolekulares Spreading) als auch die Verschiebung der Immunantwort von T-Zellen auf ein anderes Epitop desselben ursprünglichen Autoantigens (intramolekulares Spreading), konnten bei an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen werden (Deeg et al., 2006a). Die Beteiligung des Epitop Spreadings an der Pathogenese der ERU könnte die für diese Erkrankung charakteristischen, periodisch auftretenden Entzündungsschübe erklären (Deeg et al., 2006a).

2.2.3 Das Auge als immunprivilegiertes Organ

Der Biologe Peter Medawar führte im Jahr 1948 den Begriff „Immunprivileg“ für das Phänomen ein, das er im Zuge seiner Transplantationsversuche beobachten konnte. Er zeigte, dass Hautstücke, die in die vordere Augenkammer transplantiert wurden, länger dort verweilen konnten als in anderen Bereichen des Körpers, ohne eine Abstoßungsreaktion zu induzieren. Aus diesen Beobachtungen schlussfolgerte er, dass das Immunprivileg im Auge durch das Fehlen eines lymphatischen Abflusses in diesen Organen ausgelöst wird. Die damit verbundene Sequestration von Fremdgewebe hätte den Verlust einer Immunantwort zur Folge (Medawar, 1948). Jedoch konnten Untersuchungen zum Immunprivileg in den letzten Jahren diese Theorie widerlegen. Nach heutigem Verständnis entsteht das Immunprivileg nicht durch die immunologische Ignoranz, sondern vielmehr durch Mechanismen, die eine Immunantwort unterdrücken oder limitieren (Niederkorn and Streilein, 1982). Diese Mechanismen sind durch ein dynamisches Wechselspiel zwischen anatomischen Schutzvorkehrungen wie der Blut-Retina-Schranke, der Expression von löslichen und membrangebundenen immunsuppressiven Faktoren im Auge und der Induktion einer einzigartigen Antigen-spezifischen Immuntoleranz gekennzeichnet (Coburn et al., 2016, Maslanka et al., 2017). Dieser als *anterior chamber-associated immune deviation* (ACAID) bezeichnete Mechanismus beschreibt die verzögerte Immunantwort auf ein in der vorderen Augenkammer platziertes Antigen (Streilein and Niederkorn, 1981). Diese verzögerte Immunantwort auf ein Fremdprotein in der vorderen Augenkammer ist für die Erhaltung der Sehfähigkeit unerlässlich. Untersuchungen im Mausmodell zeigten, dass ein in die vordere Augenkammer eingebrachtes Fremdprotein von gewebestämmigen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) erkannt und prozessiert werden. So konnte anhand eines F4/80^{-/-} Mausmodells demonstriert werden, dass die Präsentation des Antigens über F4/80⁺ Makrophagen erfolgt (Lin et al., 2005), die in der Milz unter anderem mit natürlichen Killerzellen (NK) und CD8⁺-Zellen interagieren. Weitere Untersuchungen mit C57BL/6 Mäusen zeigten eine darauf folgende Differenzierung zu regulatorischen CD8⁺-T-Zellen (Faunce and Stein-Streilein, 2002), die die Immunreaktion auf das Antigen verändern. Auf diese Weise erfolgte eine CD4⁺- T-Zell-vermittelte Hemmung der DTH-Immunantwort (delayed-type hypersensitivity), die einen wesentlichen Einfluss auf die Erhaltung des okulären Immunprivilegs hat (Streilein and Niederkorn,

1985). Diese Mechanismen sind essentiell für die Erhaltung der Sehfähigkeit, indem sie die intraokularen Strukturen vor inflammatorischen Einflüssen schützen. Im Fall einer Infiltration von autoreaktiven T-Zellen jedoch wird dieses Immunprivileg zum Verhängnis (Caspi, 2006). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch die Induktion einer peripheren Toleranz gegenüber retinaler Autoantigene, autoreaktive T-Zellen zunächst ungehindert die Blut-Retina-Schranke überwinden können, ohne inaktiviert oder zu regulatorischen T-Zellen konvertiert zu werden (Zhou and Caspi, 2010). Stattdessen kommt es zu einem vollständigen Zusammenbruch des intraokularen Immunprivilegs, der mit der Zerstörung retinaler Strukturen einhergeht (Horai et al., 2013).

2.3. Immunologie von Uveitiden

2.3.1 Autoimmune Uveitis des Menschen

Die humane autoimmune Uveitis (HAU) stellt unter den Uveitiden beim Menschen die häufigste Form dar (Chen et al., 2016, Luca et al., 2017). Sie tritt sowohl idiopathisch als auch als Begleitsymptom systemischer Autoimmunerkrankungen wie Morbus Behçet (Diwo et al., 2016), dem Vogt-Koyani-Harada-Syndrom (Veerappan et al., 2016) oder der multiplen Sklerose (Jouve et al., 2016) auf. Die genauen Pathomechanismen konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Jedoch zeigen die bisherigen Erkenntnisse, dass es sich bei der HAU um eine T-Zell medierte Erkrankung handelt (Jiang et al., 2015). Aufgrund Fehlfunktionen des Immunsystems kommt es bei der autoimmunen Uveitis zur Zerstörung retinaler Strukturen durch autoreaktive T-Lymphozyten. Neben den Netzhautschäden treten weitere Komplikationen wie die Katarakt, das Sekundärglaukom oder das zystoide Makulaödem auf (Gritz et al., 2017). Die Therapie der Erkrankung beschränkt sich vor allem auf die immunsuppressive Behandlung und ist mit Nebenwirkungen und Einschränkungen für den Patienten verbunden (Henderson et al., 2016). Daher ist die Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen dieser Erkrankung für die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie von großer Bedeutung. Für die Aufklärung der Pathogenese der HAU wird Probenmaterial von erkrankten Menschen benötigt, welches allerdings begrenzt und oft nur im Endstadium der Erkrankung zur

Verfügung gestellt werden kann (Caspi, 2014). Daher wird aufgrund einer Limitation geeigneten Probenmaterials größtenteils auf Tiermodelle zurückgegriffen (Caspi, 2010).

2.3.2 Experimentell induzierbare autoimmune Uveitis

Die experimentell induzierte autoimmune Uveitis wurde im 20. Jahrhundert zur Einführung eines Tiermodells der autoimmunen Uveitis des Menschen entwickelt. Zunächst gelang es in tierexperimentellen Versuchen, durch eine subkutane Injektion in Freund's Adjuvanz gelöster Uvea oder Retina eine Uveitis beim Meerschweinchen auszulösen (Wacker and Lipton, 1965). Auf dieser Forschungsarbeit bauten in den darauffolgenden Jahren weitere Untersuchungen auf, die die Entdeckung des retinalen Autoantigens S-Antigen (S-Ag) ermöglichten (Wacker et al., 1977). Zahlreiche Versuche zu der Rolle von Autoantigenen in der experimentellen autoimmunen Uveitis folgten und es gelang die Etablierung weiterer Tiermodelle. Von besonderer Bedeutung waren das retinale Autoantigen S-Ag und das Interphotorezeptor Retinoid bindende Protein (IRBP) bei der Induktion einer Uveitis im Tiermodell (Caspi et al., 1988). Während S-Ag vor allem bei Meerschweinchen (Wacker et al., 1977) und Ratten (Fox et al., 1987) als potentes Uveitogen wirkt, lässt sich eine Uveitis durch die Applikation von IRBP bei Ratten (Chan et al., 1987), Mäusen (Caspi et al., 1988), Kaninchen (Eisenfeld et al., 1987), Pferden (Deeg et al., 2002b) und Primaten (Hirose et al., 1986) induzieren. Für die Uveitisforschung war die erfolgreiche Etablierung eines Mausmodells (Caspi et al., 1988) von besonderer Bedeutung. Die vielseitigen Möglichkeiten, die sich im Mausmodell ergeben, basieren unter anderem auf dem Einsatz transgener Stämme, die umfassende Untersuchungen zu unterschiedlichen Pathogenese-assoziierten Mechanismen erlauben (Chen et al., 2013). Aufgrund der Tatsache, dass eine Uveitis bei der Maus durch die Applikation von S-Ag nicht induziert werden konnte, war es das Ziel ein uveitogen wirkendes retinales Autoantigen in der Maus zu identifizieren (Caspi et al., 1988). Durch die Immunisierung von Mäusen mit dem retinalen Autoantigen IRBP war es erstmalig möglich eine Uveitis im Mausmodell zu induzieren (Caspi et al., 1988). Von diesem Zeitpunkt an war es möglich die Pathophysiologie der autoimmunen Uveitis an transgenen und Knock-out Mäusen zu untersuchen (Liang

et al., 2017a). Neben weiterführenden Untersuchungen zur Immunisierung mit IRBP (Mattapallil et al., 2015) wurde der adoptive Transfer von sensibilisierten Retina-Autoantigen-spezifischen T-Lymphozyten zur Induktion einer EAU herangezogen. Zunächst wurde dieser Mechanismus ausschließlich bei Ratten angewendet (Caspi, 2003). Dabei wurden Lymphknoten- oder Milzzellen eines mit S-Ag immunisierten Donortieres durch intraperitoneale Injektion in ein naives Empfängertier transferiert, das daraufhin eine Uveitis entwickelte (Mochizuki et al., 1985). Durch die Immunisierung des Donortieres mit dem Retina-spezifischen Antigen werden die Zellen zunächst *in vivo* sensibilisiert und nach der Entnahme durch die *in vitro* Behandlung mit demselben Antigen aktiviert (Mochizuki et al., 1985). Durch eine radioaktive Markierung dieser Zellen vor dem Transfer in das Empfängertier konnte die Zellverteilung im Organismus nach der intraperitonealen Injektion sichtbar gemacht werden (Palestine et al., 1986). Der Großteil der Zellen war in Leber, Thymus, Milz und Hoden verteilt und nur ein geringer Anteil konnte im Auge detektiert werden. Dennoch wurde auf diese Weise eine Uveitis im Empfängertier induziert (Palestine et al., 1986). Durch den Transfer von IRBP-spezifischen T-Zellen konnte eine Uveitis sowohl in der Lewis-Ratte als auch im Mausmodell induziert werden (Shao et al., 2006). Dafür wurden Milz- und Lymphknotenzellen von mit IRBP immunisierten B10.RIII oder C57BL/6 Mäusen *in vitro* kultiviert und in ein Empfängertier transferiert (Shao et al., 2006, Agarwal et al., 2012). Dabei wurden gezielt die Effektorzellen eingesetzt, die von besonderem Interesse waren, wie beispielsweise T-Lymphozyten (Jiang et al., 2015) oder auch zu Th17-Zellen (Eskandarpour et al., 2017) differenzierte Zellen. Die transferierten Effektorzellen induzierten bei dem Empfängertier eine EAU (Eskandarpour et al., 2017). Damit gibt der adoptive Transfer einen interessanten Aufschluss über die Bedeutung der gegen uveale Antigene sensibilisierten T-Lymphozyten bei der autoimmunen Uveitis.

2.3.3 ERU als spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis

Die Etablierung von Tiermodellen zur Untersuchung der autoimmunen Uveitis war ein entscheidender Schritt für die Aufklärung der Pathogenese und neue Therapieansätze (Caspi et al., 1988). Bei der Untersuchung der Pathomechanismen,

die der HAU zu Grunde liegen, ist der Einsatz von Tiermodellen obligatorisch. Jedoch kann keines dieser Tiermodelle die autoimmune Uveitis des Menschen vollständig widerspiegeln (Caspi, 2010). Die Defizite der experimentell induzierten Uveitis in den eingesetzten Tiermodellen liegen in der mangelnden Übertragbarkeit auf die Pathogenese der HAU. Durch den Einsatz homogener Inzuchtstämme wird die Komplexität der Erkrankung nur unzureichend repräsentiert (Agarwal et al., 2012). Des Weiteren sind initiiierende Faktoren bei der EAU bereits bekannt, wodurch die Untersuchung auslösender Agenzien der autoimmunen Uveitis des Menschen nur eingeschränkt möglich ist (Horai et al., 2013). Auch die Etablierung von transgenen R161H und Aire^{-/-} Mausmodellen, bei denen eine chronische Uveitis mit Rezidiventstehung spontan auftritt, dient nur zur Untersuchung von Teilaspekten der autoimmunen Uveitis des Menschen (Chen et al., 2013). In der Uveitisforschung weist die ERU einen entscheidenden Vorteil gegenüber der EAU auf. Die Vergleichbarkeit mit der humanen Autoimmunuveitis wird durch den spontanen Charakter der Erkrankung gewährleistet und macht die ERU damit zu einem idealen Tiermodell (Deeg, 2008). Die Gemeinsamkeiten in der Pathogenese äußern sich vor allem in dem chronisch-rezidivierenden Verlauf und den klinischen Übereinstimmungen beider Erkrankungen (Deeg et al., 2008). Wie auch in anderen Tiermodellen konnten beim Pferd S-Ag und IRBP als Uveitis induzierende retinale Autoantigene identifiziert werden (Deeg et al., 2001, Deeg et al., 2002b). Weitere Untersuchungen ermöglichten die Identifikation eines neuen, noch nie vorher beschriebenen Autoantigens, dem zellulären Retinaldehyd-bindenden Protein (CRALBP) (Deeg et al., 2006b). CRALBP wird in Müller-Glia Zellen und in Zellen des retinalen Pigmentepithels exprimiert und spielt eine bedeutende Rolle im Sehzyklus (Sato and Kefalov, 2016). Durch dieses Autoantigen konnte eine Uveitis nicht nur im Pferd, sondern auch in der Lewis Ratte induziert werden (Deeg et al., 2006b). Wenig später wurde CRALBP auch als humanes retinales Autoantigen identifiziert und stellt damit eine Gemeinsamkeit zwischen der ERU und der HAU her (Deeg et al., 2007). Somit dient das Pferd als überaus geeignetes Modell für die autoimmune Uveitis des Menschen.

2.4 Proteomik

2.4.1 Protein-Protein-Interaktionen

Protein-Protein-Interaktionen (PPI) bilden die Grundlage essentieller zellulärer Funktionen, wie Zellproliferation, Zellteilung, Apoptose und Signaltransduktion (Cunningham et al., 2017). Um die Funktion eines Proteins vollständig zu begreifen, ist die Identifikation seiner Interaktionspartner von entscheidender Bedeutung. Auch wenn das Human-Genom-Projekt, das 1990 in den USA gegründet wurde, einen bedeutenden Fortschritt mit der Entschlüsselung des humanen Genoms im Jahr 2001 erzielte, so sind viele zelluläre Funktionen und Mechanismen der identifizierten Gene bis heute ungeklärt. Während das Genom einen statischen Zustand aller Informationen in einer Zelle beschreibt, ist das Proteom durch einen dynamischen Wechsel aller Abundanzen und Konformationen vorliegender Proteine einer Zelle gekennzeichnet, die zelluläre Funktionen maßgeblich beeinflussen (Breker et al., 2013). Um diese Funktionen endgültig zu begreifen, ist die Analyse des Proteoms unerlässlich (Lander et al., 2001). Das Ziel der Proteomik umfasst auch die Analyse der zellulären Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke, die einen bedeutenden Aufschluss sowohl über die physiologischen Mechanismen in der Zelle als auch über pathophysiologische Ereignisse bieten können (Hosp et al., 2015). PPI zeichnen sich zum einen durch die Bildung stabiler Komplexe und zum anderen durch dynamische Interaktionen aus, die auf extrinsische und intrinsische Stimuli reagieren (Nudelman et al., 2016, Perkins et al., 2010). Dabei beruhen Protein-Protein-Interaktionen überwiegend auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie van der Waals Kräften, hydrophoben Effekten und elektrostatischen Effekten (Calero-Rubio et al., 2016). Während des Kontakts der Proteine mit ihren Interaktionspartnern treten Konformationsänderungen oder posttranslationale Modifikationen (PTM) in ihrer Struktur und damit auch eine Änderung ihrer Aktivität und Funktion auf (Hsu et al., 2013). Die Interaktion zwischen Proteinen, die eine Rolle in der zellulären Signalübertragung spielen, ist dabei oft nur vorübergehend. Diese Änderungen müssen bei der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen berücksichtigt werden (Cunningham et al., 2017). In der Interaktionsproteomik galt die Kombination einer Immunpräzipitation und der anschließenden Darstellung im Western Blot lange als Goldstandard (Bridgeman et al., 2010). Jedoch konnten sich in den letzten

Jahren weitere effiziente Methoden zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen bewähren (Zhang et al., 2017, Bridgeman et al., 2010). Die Immunpräzipitation ist eine sehr effektive Methode, die es ermöglicht in einem Pulldown-Assay das Zielprotein mitsamt seiner Interaktionspartner aus einem Zelllysats zu isolieren (Zhang et al., 2017). Dabei werden Antigene aus einer Probe mitsamt ihrer Interaktionspartner an Antikörper gebunden, die an eine stationäre Phase, beispielsweise Sepharose G Beads gekoppelt sind (Antrobus and Borner, 2011). Auf diese Weise ermöglicht es die Immunpräzipitation, Protein-Protein-Interaktion unter *in vivo* ähnlichen Verhältnissen zu detektieren (Ren et al., 2003). Die anschließende Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen im Western Blot ist allerdings mit Einschränkungen verbunden. Um interagierende Proteine im Western Blot zu detektieren sind spezifische Antikörper notwendig, welche häufig nicht zur Verfügung stehen. So werden beispielsweise neben dem Zielprotein auch leichte und schwere Ketten des bei der Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers auf der gleichen Höhe detektiert (Bridgeman et al., 2010). Ein ausschlaggebender Nachteil dieser Methode ergibt sich in der gezielten Analyse einzelner Protein-Protein-Interaktionen, statt eines breit gefächerten Screenings zur Detektion sämtlicher Interaktionspartner eines Proteins (Aslam et al., 2017). Des Weiteren können mittels Western Blot nur statische qualitative Informationen über die Protein-Protein-Interaktionen gewonnen werden, ohne eine zuverlässige quantitative Analyse dieser Interaktionen zu ermöglichen (Lee et al., 2013). Um die gesamten Protein-Protein-Interaktionen eines Proteins umfassender zu identifizieren, hat sich die massenspektrometrische Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit vorangegangener Immunpräzipitation bewährt (Zhang et al., 2017). Die Massenspektrometrie hat in den letzten Jahren enorme Bedeutung in der Proteomik erlangt und wurde im Jahr 2012 von der Zeitschrift *Nature Methods* sogar zur „method of the year“ gekürt (vgl. *Nature Methods*, 2013 Vol. 10, Nr.1). Die Anfänge dieser äußerst präzisen Technologie entstanden bereits vor über 100 Jahren, als der Physiker J.J. Thomson gemeinsam mit F.W. Aston die Masse elementarer Isotope bestimmte. Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Bestimmung der molekularen Masse von geladenen Partikeln. Dies erfolgt durch die Messung ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z), dessen Einheit nach seinem Entdecker Thomson (th) benannt wurde (Lossl et al., 2016). Das Massenspektrum stellt dabei eine Auftragung der Ionenhäufigkeit gegen m/z dar (Paul et al., 2013). Seit der

Entdeckung dieser Technologie wurde die Massenspektrometrie stets weiter entwickelt und ist heute eine effektive und äußerst sensitive Methode in der Proteinanalytik (Grosche et al., 2016). Die massenspektrometrische Analyse ermöglicht eine eindeutige Identifikation und Quantifizierung von Peptiden durch die Bestimmung ihrer exakten molekularen Masse anhand ihres Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) (Paul et al., 2013). Die Peptide durchlaufen das Massenspektrometer, das aus drei grundlegenden Komponenten besteht: der Ionenquelle, dem Analysator, in dem Ionen nach ihrem m/z aufgetrennt werden können und dem Detektor, der die Anzahl der Ionen eines bestimmten m/z Verhältnisses erfasst (Paul et al., 2013). Durch eine zusätzliche Fragmentierung der Peptide erstellt die Massenspektrometrie einen „molekularen Fingerabdruck“, der es ermöglicht, Proteine auf ihrer molekularen Ebene zu charakterisieren (Brandtzaeg et al., 2016). Diese Fragmentierung der Peptide wird durch Elektrostößionisation erreicht und erhöht die Selektivität der Proteinidentifikation bedeutend. Das dann als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bezeichnete Verfahren kann durch eine vorangeschaltete Flüssigkeitschromatografie (LC) zusätzlich für die Analyse komplexer Peptidgemische optimiert werden (Brandtzaeg et al., 2016). Vor der Flüssigkeitschromatografie werden die Proteine zunächst enzymatisch verdaut und dann in einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) aufgetrennt (Wang et al., 2015). Die eluierten Peptide werden dabei direkt über einen Sprühkopf und mittels Electrospray-Ionisation in das Massenspektrometer eingeleitet und dort alternierend entweder genau Massen-analysiert (MS) oder fragmentiert (MS/MS) (Wang et al., 2015). Um Protein-Protein-Interaktionen massenspektrometrisch zu analysieren, haben sich neben der Co-Immunpräzipitation noch weitere Methoden etabliert. Eine dieser Methoden, um Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren ist das Cross-Linking mit nachfolgender LC-MS/MS Massenspektrometrie. Dieses Verfahren basiert auf einer durch Quervernetzungsreagenzien geschaffenen kovalenten Bindung zwischen Aminosäuren (Kita et al., 2016). Durch diese kovalenten Bindungen können auch transiente Protein-Protein-Interaktionen identifiziert werden. Cross-Linking ist eine sehr effektive und sensitive Methode, um Proteine und Proteinkomplexe strukturell zu charakterisieren (Wu et al., 2016). Jedoch ist die Auswertung, der in diesem Verfahren gewonnen Daten, mit erheblichem Aufwand verbunden, der die Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen erschwert (Liu et al., 2015). Aus diesem Grund ist auch heute noch die

Immunpräzipitation der Goldstandard zur Untersuchung des Interaktoms. Die Vorteile dieser Methode liegen in ihrer relativ einfachen Anwendung, die die Standardisierung umfassender Untersuchungen ermöglicht. Zwar werden spezifische Antikörper für die Durchführung der Immunpräzipitation benötigt, um unspezifische unerwünschte Antikörperbindungen zu verhindern. Trotzdem ergibt sich mit der Immunpräzipitation in Kombination mit weiteren Verifikationstechniken eine sehr effektive Methode für die Untersuchungen der Protein-Protein-Interaktionen. In Kombination mit der LC-MS/MS basierten Massenspektrometrie stellt dieses Verfahren eine effektive Methode zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen dar (Zhang et al., 2017).

2.4.2 Quantitative Proteinanalyse

Neben Untersuchungen zum Interaktom sind in der Proteomik auch quantitative Proteinanalysen von Bedeutung. Das Proteom spiegelt die Gesamtheit aller vorliegenden Proteine zu einem definierten Zeitpunkt wider (Wilkins et al., 1996a, Wilkins et al., 1996b). Im Gegensatz zum Genom zeichnet sich das Proteom durch einen dynamischen Zustand aus, der sich durch extrinsische und intrinsische Faktoren qualitativ und quantitativ verändert. Diese quantitativen Veränderungen im Proteom können mittels differentieller Proteinanalytik erfasst werden. Damit ermöglichen unterschiedliche Technologien auch den Vergleich physiologischer Proteinexpression mit Pathogenese-assoziierten Veränderungen im Proteom (Hauck et al., 2010, Uhl et al., 2014). Eine dieser Methoden ist die quantitative Proteomik mittels massenspektrometrischer Analyse. Die Massenspektrometrie bietet nicht nur die Möglichkeiten einer qualitativen Proteinbestimmung, sondern ermöglicht auch eine genaue Proteinquantifizierung (Grosche et al., 2016). Hierbei können die Peptide mit einem Label markiert werden oder mit einer Label-freien Methode bestimmt werden. Eine der Labelling-Methoden, die bei der Quantifizierung von Proteinen angewendet werden, ist iTRAQ (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*)(Jiang et al., 2017). iTRAQ-Reagenzien, die in unterschiedlichen Molmassen verfügbar sind, werden den zu untersuchenden, bereits einem Trypsin-Verdau unterzogenen Proben zugeführt (Casey et al., 2017). Die markierten Proben werden anschließend chromatographisch fraktioniert und massenspektrometrisch analysiert (Jiang et al., 2017, Casey et al., 2017). Des Weiteren wird SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture*) als Labelling-Methode zur

quantitativen Proteinanalyse verwendet (Li et al., 2016). Hierbei werden kultivierten Zellen *in vivo* isotoopenmarkierte Aminosäuren, wie Lysin und Arginin, über mehrere Passagen hinweg in die Zelle eingebaut (Li et al., 2016). Neben den beschriebenen Label-Methoden gibt es noch weitere Möglichkeiten Proteine mittels Labelling zu quantifizieren. Bedeutende Nachteile ergeben sich allerdings in der aufwändigen Probenvorbereitung und teils unvollständigem Labelling (Sandberg et al., 2014). Aufgrund der einfachen und effektiven Anwendung wird in der Proteomik daher hauptsächlich eine Label-freie Quantifizierung angewandt (Navarro et al., 2016).

2.5 Septin 7 als differentiell exprimiertes Protein bei der ERU

Bisherige proteomische Untersuchungen zu der equinen rezidivierenden Uveitis konnten wichtige Erkenntnisse über Pathogenese-assoziierten Veränderungen im Leukozytenproteom von an ERU erkrankten Pferden liefern (Degroote et al., 2014, Degroote et al., 2017, Degroote et al., 2012). Vor allem das Expressionsmuster eines bestimmten differentiell exprimierten Proteins, Septin 7, war für die nähere Charakterisierung von besonderem Interesse (Degroote et al., 2014). Die zytoskelettale GTPase Septin 7 wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als ein in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden niedriger exprimiertes Protein identifiziert (Degroote et al., 2014). Septin 7 gehört mit 13 anderen Mitgliedern zu der Familie der Septine, die mit einer Reihe von bedeutenden zellulären Funktionen assoziiert werden (Abbey et al., 2016). Neben bedeutender strukturgebender Funktionen von Septinen im Zytoskelett konnte eine Beteiligung der Proteine bei Zellteilung, Chromosomensegregation, Migration und Apoptose gezeigt werden (Hou et al., 2016, Torii et al., 2016, Spiliotis et al., 2005). In den letzten Jahren wurden die Auswirkungen einer differentiellen Expression von Septinen aufgrund vermehrter Assoziationen mit zahlreichen Erkrankungen eingehend untersucht. So konnte gezeigt werden, dass Septine sowohl in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Kinoshita et al., 1998) oder Morbus Parkinson (Rozenkrantz et al., 2016), als auch in Krebserkrankungen eine bedeutende Rolle spielen (Zhang et al., 2016). Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen, wie Brustkrebs, dem malignen Gliom und papillären Thyroidkarzinom, wurde eine verminderte Expression von Septin 7 festgestellt (Zhang et al., 2016, Jia et al., 2010). Septin 7 spielt in der

Familie der Septine eine Schlüsselrolle, indem es in der Lage ist, die Expression anderer Septine zu kontrollieren (Zhang et al., 2016). Welche Mechanismen bei diesem Prozess genau in Kraft treten, konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Jedoch wurde aufgrund einer kürzlich veröffentlichten Studie vermutet, dass Septin 7 eine protektive und stabilisierende Wirkung auf andere Septine ausübt (Zhang et al., 2016). Eine ausbleibende Septin 7-Expression führt somit auch zu verminderter Expression anderer Septine, wie Septin 2 (Zhang et al., 2016). Eine überaus interessante Rolle von Septinen ist die Stabilisation des Zytoskeletts. Die Folgen einer verminderten Septin 7-Expression auf die Regulation von T-Zell-Form und -Motilität spiegeln sich in einer erhöhten Migrationsbereitschaft dieser Zellen durch kleine Poren wider (Tooley et al., 2009). Septin 7-defiziente T-Zellen verlieren an Stabilität und weisen eine veränderte Zellmorphologie auf (Tooley et al., 2009). Dieses Erkenntnis ist im Hinblick auf die Pathogenese der ERU besonders interessant, da bei dieser Erkrankung autoreaktive T-Zellen die Blut-Retina-Schranke passieren, eine Barriere, die normalerweise eine Infiltration von Zellen in das Augeninnere verhindert (Uhl et al., 2014, Szober et al., 2012). Die Funktion von Septin 7 hängt entscheidend von den Interaktionsnetzwerken dieses Proteins ab (Wasik et al., 2017). Beim Menschen wurden bereits Analysen zum Interaktionsnetzwerk von Septin 7 beschrieben (Nakahira et al., 2010). Bisher lag der Schwerpunkt hauptsächlich auf den Protein-Protein-Interaktionen von aus humanen cDNA-Bibliotheken gewonnenem Septin 7 mit anderen Septinen (Nagata et al., 2004, Serrao et al., 2011). Des Weiteren wurden Diabetes-Studien zu Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 in den Podozyten von Mäusen und Menschen durchgeführt (Wasik et al., 2012, Wasik et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass Septin 7 mit anderen Septinen große Polymere bildet, die sich wiederum zu Filamenten zusammenschließen (Kinoshita et al., 2002, Serrao et al., 2011). Diese Filamente bilden ein zelluläres Gerüst, das mit weiteren Proteinen, wie beispielsweise Komponenten des SNARE-Komplexes (Wasik et al., 2017) in Interaktion tritt. Es wird angenommen, dass interagierende Proteine anhand dieser Filamente zu ihrem Bestimmungsort gelangen und zelluläre Funktionen erfüllen (Kim et al., 2012). Damit erfüllen Septine bedeutende zelluläre Funktionen und die Aufklärung der Interaktionsnetzwerke der Proteine ist von unerlässlicher Bedeutung (Kim et al., 2012). Zur Protein-Protein-Interaktion von Septin 7 mit Proteinen, die nicht zur Familie der Septine gehören, wurden bisher nur wenige Untersuchungen

durchgeführt (Nakahira et al., 2010, Wasik et al., 2017). Des Weiteren sind die Information über Septin 7-Interaktionen in den Zellen geeigneter Modelle für die autoimmune Uveitis des Menschen nicht ausreichend. Da das Pferd ein hervorragendes Modell für die Erforschung dieser Erkrankung darstellt und bisher keine Analyse der Septin 7-Interaktoren in Pferdezellen beschrieben wurde, stellt die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 einen interessanten Forschungsansatz dar. Ausgangspunkt dieser Arbeit war es deshalb, die Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 zu untersuchen, um die Funktion des Proteins in Pferdezellen näher zu charakterisieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Proben von insgesamt 19 gesunden und 49 an ERU erkrankten Pferden gewonnen. Die Diagnose der equinen rezidivierenden Uveitis wurde in der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand Prof. Dr. H. Gerhards) anhand klinischer Kriterien wie Blepharospasmus und vermehrter Lakrimation gestellt (Gilger and Michau, 2004, Schwink, 1992). Bei den betroffenen Tieren erfolgte eine Blutentnahme. Die Blutprobenentnahme von Pferden wurde bei der Regierung von Oberbayern unter der Genehmigungsnummer 55.2-1-54-2532.3-22-12 angezeigt. Die augengesunden Kontrolltiere wurden entsprechend in Alter, Geschlecht und Rasse passend zu den an ERU erkrankten Pferden ausgesucht. Die Blutproben dieser Tiere wurden uns unter anderem von der Abteilung Innere Medizin und Gynäkologie der Klinik für Pferde unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Göhring zur Verfügung gestellt. Die Blutproben wurden in unterschiedlichen Versuchen eingesetzt. Insgesamt wurde bei den einzelnen Experimenten die folgende Anzahl equiner Blutproben untersucht.

Immunpräzipitation mit Septin 7:

- PBL eines augengesunden Pferdes

Phänotypisierung und Expressionsanalyse von HCLS1 in Pferdelymphozyten:

- Durchflusszytometrie (Phänotypisierung): PBL von fünf Kontrollpferden
- Durchflusszytometrie (differentielle Proteinanalyse): PBL von fünf gesunden und fünf ERU-Pferden
- Immunzytochemischen Untersuchung: PBL eines Kontrollpferdes und eines an ERU erkrankten Pferdes

Verifikationsexperiment zur Interaktion von Septin 7 und DOCK8:

- PBL eines gesunden Pferdes

Phänotypisierung und Expressionsanalyse von DOCK8 in Pferdelymphozyten:

- Durchflusszytometrie (Phänotypisierung): PBL von 13 Kontrollpferden
- Western Blot: PBL von 16 Kontrollpferden und 36 an ERU erkrankten Pferden
- Durchflusszytometrie (differentielle Proteinanalyse): PBL von 13 Kontrollpferden und 12 an ERU erkrankten Pferden

Immunpräzipitation mit DOCK8 und Septin 7 (vgl. Kap.4.2; 4.3):

- Identifikation Interaktionspartner DOCK8: PBL von drei gesunden Pferden
- Identifikation interagierender Signaltransduktionmoleküle: PBL von drei gesunden und drei an ERU erkrankten Pferden

Verifikation Interaktion mit STAT1 und ILK:

- PBL eines gesunden Pferdes

Expressionsanalyse von STAT1 und pSTAT1 in Pferdelymphozyten:

- Durchflusszytometrie: PBL drei gesunder Pferde
- Western Blot: PBL 12 gesunder und 18 an ERU erkrankter Pferde

Expressionsanalyse von ILK in Pferdelymphozyten:

- Western Blot: PBL von 16 Kontrollpferden und von 28 an ERU erkrankten Pferden

3.1.1 Puffer und Lösungen zur Gewinnung und Aufbereitung von PBL

Heparinlösung zur Gerinnungshemmung (2.500 I.E./ml)

Heparin-Natrium ¹ (25.000 I.E./ml)	1,00 ml
RPMI 1640 Medium mit Glutamin ²	9,00 ml

Trennlösung zur Isolierung von PBL mittels Dichtegradientenzentrifugation

Pancoll Trennlösung³ (Dichte 1,077g/ml), gebrauchsfertig

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

NaCl ⁴ (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (1,4 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,1 mM)	1,45 g
in 1000 ml Aqua dest. lösen, pH-Wert auf 7,2 einstellen.	

Einfriermedium

DMSO (10%)	1,00 ml
FCS ³ (90%)	9,00 ml
bei -20°C lagern.	

¹ Ratiopharm, Ulm

² ThermoFisher Scientific, Frankfurt am Main

³ Pan Biotech, Aidenbach

⁴ Alle nicht extra markierten Chemikalien: AppliChem, Darmstadt

Lysepuffer Western Blot

Harnstoff ⁵ (9 M)	27,00 g
Thioharnstoff ⁶ (2 M)	7,60 g
CHAPS ⁶ (4 %)	2,00 g
DTT ⁷ (65 mM)	0,50 g

ad 50 ml Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur (RT) mindestens fünf Stunden rühren. Anschließend zu je 1 ml aliquotieren und bei -20°C lagern. Direkt vor Gebrauch 100 µl Aqua bidest. pro 1 ml Lysepuffer zusetzen.

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 7,3

Tris ⁷ (50 mM)	1,21 g
NaCl ⁸ (150 mM)	8,76 g

in 1000 ml Aqua bidest. lösen.

pH auf 7,3 einstellen.

Lysepuffer Immunpräzipitation (IP)

3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) ⁶ (2 %)	0,2 g
--	-------

in 10 ml TBS lösen.

Kurz vor Gebrauch mit 200 µl Proteaseinhibitor (50 x Complete, EDTA-frei⁹) versetzen.

⁵ GE Healthcare, Freiburg

⁶ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁷ Serva, Heidelberg

⁸ Applichem, Darmstadt

⁹ Roche, Unterhaching

3.1.2 Gewinnung der Blutproben

Bei den Pferden erfolgte nach vorangegangener Desinfektion der Injektionsstelle eine Blutentnahme von je nach Bedarf 20-200 ml Blut aus der Vena jugularis, das zu jeweils 15 ml in Röhrchen¹⁰ mit 200 µl einer Heparin-Lösung (2.500 I.E./ml) abgefüllt wurde.

3.1.3 Gewinnung von peripheren Blutleukozyten (PBL) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die mit dem Vollblut befüllten Röhrchen wurden zur Sedimentierung 10-20 Minuten bei Raumtemperatur aufgestellt. Mit einer sterilen Pipette konnte das überstehende Plasma-PBL-Gemisch vorsichtig aufgenommen und separat in 15 ml Röhrchen zu gleichen Teilen auf 3 ml Pancoll¹¹ Trennlösung geschichtet werden. Nach der im Anschluss erfolgten Dichtegradientenzentrifugation (23°C, 290 rcf, 25 Minuten, Bremse ausgeschaltet) wurde die zwischen Plasma und Pancoll befindliche Interphase unter minimaler Aspiration vollständig abgenommen und in kaltes PBS überführt. In zwei nachfolgenden Waschschritten (4°C, 415 rcf, 10 Min) wurde der nach der Zentrifugation entstandene Überstand dekantiert und das gewonnene Pellet mit frischem PBS resuspendiert. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die gewonnenen PBL entweder direkt verwendet oder zur Aufbewahrung bearbeitet.

¹⁰ Sarstedt, Nürnberg

¹¹ Pan Biotech, Aidenbach

3.1.4 Zählung der gewonnenen Zellen

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte manuell mittels einer Neubauer-improved-Zählkammer¹². Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau¹³ versetzt. Diese Mischung konnte anschließend in der Zählkammer ausgezählt werden. Waren in fünf diagonal angeordneten Gruppenquadranten mehr als 100 Zellen zu verzeichnen, wurden diese zur Berechnung der Gesamtzellzahl herangezogen. Waren weniger als 100 Zellen vorhanden, wurden die gesamten 25 Gruppenquadrate ausgezählt.

Die Gesamtzellzahl wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammertiefe [mm]} \cdot \text{Verdünnung}}$$

3.1.5 Aufbewahrung von lebenden PBL

Für die spätere Verwendung lebender PBL wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Zur Aufbereitung wurde die Zellsuspension nach der Zellzählung bei 415 rcf abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Resuspendierung von 2×10^7 Zellen in 1,5 ml Einfriermedium und die Überführung der Zellen in Einfrierröhrchen¹⁴. Die Zellsuspension wurde schonend auf -80°C heruntergekühlt. Direkt vor deren Verwendung erfolgte das Auftauen der Zellen unter vorsichtigem Resuspendieren mit eiskaltem PBS. Die zwei nachfolgenden Waschschrte bei 4°C (415 rcf, 10 Min) dienten der Entfernung des DMSO.

¹² NeoLab, Heidelberg

¹³ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

¹⁴ Sarstedt, Nürnbrecht

3.1.6 Aufbereitung der PBL für Western Blots

Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C (415 rcf, 10 Min). Der Überstand der Leukozytenpellets wurde verworfen und die Zellstrukturen der PBL durch Zugabe von 200-1000 µl Lysepuffer zerstört.

3.1.7 Aufbereitung der PBL für die Immunpräzipitation

Wie auch bei der, in Kap. 3.1.6 beschriebenen Aufbereitung der PBL für Western Blots, erfolgte die Aufbereitung der Zellsuspension für die Immunpräzipitation zunächst durch Zentrifugation bei 415 rcf. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und verworfen. Die PBL wurden anschließend in 100 µl Chaps-Lysepuffer pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und bei Raumtemperatur fünf Minuten lang inkubiert. Zwischenzeitlich wurde die Zelllösung sorgfältig gevortext, bis das Lysat eine flüssige Form überführt werden konnte. Durch Übertragen des Zelllysats in den QIAshredder Homogenisator und anschließender zehnminütiger Zentrifugation bei 16100 rcf erfolgte eine Trennung des proteinhaltigen Überstands von zellulären Restkomponenten. Abschließend folgte eine Proteinbestimmung des Überstands für die weitere Verwendung.

3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate

3.2.1 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz

5 x Bradford Reagenz ¹⁵	1,00 ml
Aqua bidest	4,00 ml

Bovines Serum Albumin (BSA)-Stammlösung (4 mg/ml)

BSA ¹⁵	40,00 mg
-------------------	----------

in 10 ml Aqua dest. lösen.

Zu je 1 ml aliquotieren und bei -20°C lagern.

Lysepuffer WB

Lysepuffer WB (siehe Kap. 3.1.1).

HCl

Salzsäure 1 M, gebrauchsfertig.¹⁶

¹⁵ Serva, Heidelberg

¹⁶ Applichem, Darmstadt

3.2.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der im Kap. 3.1.6 beschriebenen PBL-Lysate für Western Blots sowie der im Kap. 3.1.7 beschriebenen Lysate für die Immunpräzipitation erfolgte nach der von Bradford etablierten Methode (Bradford, 1976). Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet mit den im Lysat vorkommenden Proteinen Komplexe. Auf diese Weise verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Die Proteinmenge der Proben kann somit anhand der hierzu proportionalen Absorption bestimmt werden.

Zur Kalibrierung der Eichgerade wurde eine Standardreihe mit bovinen Serumalbumin (BSA) erstellt. In den Konzentrationen 0 (Leerwert); 0,125; 0,25; 0,5; 1 und 2 mg/ml wurde das Protein im verwendeten Lysepuffer gelöst und photometrisch gemessen. Je 5 µl jedes Standards und jeder zu bestimmenden Probe wurden in einem Doppelansatz in eine 96-Loch-Platte pipettiert und anschließend mit 250 µl der Bradford-Lösung versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem ELISA Reader (SUNRISE) photometrisch bestimmt. Die Absorption der doppelbestimmten Leerwerte wurde von jedem Mittelwert der doppelbestimmten Proben abgezogen und die Proteinkonzentration entsprechend an der Eichgerade abgelesen.

3.3 Immunpräzipitation

3.3.1 Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation

TBS

TBS (Kap 3.1.1).

Lysepuffer Immunpräzipitation (IP)

Chaps LP (Kap. 3.1.1)

Waschpuffer

Lysepuffer IP	2,50 ml
ad 10 ml TBS.	

Blockierlösung

BSA (4 %)	400,00 mg
in 10 ml TBS lösen.	

5 x Lämmli-Puffer (reduzierend)

1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (250 mM)	8,33 ml
20 % SDS-Lösung (5 %)	12,50 ml
Glycerin, wasserfrei (50 %)	25,00 ml
500 mM 2-Mercaptoethanol ¹⁷	1,75 ml

ad 50 ml Aqua bidest. und eine Spatelspitze Bromphenolblau¹⁷-Pulver hinzufügen.
 Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.
 Vor der Verwendung bei der Immunpräzipitation:
 Herstellung eines 2 x Lämmli-Puffers durch Verdünnung in Aqua bidest.

¹⁷ Sigma-Adrich, Taufkirchen

3.3.2 Antikörper für die Immunpräzipitation

Für die Durchführung der Immunpräzipitation fanden folgende Antikörper Verwendung:

Antikörper	Produziert in	Herkunft	Menge
anti-Septin 7	Ratte	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München ¹⁸	1 ml
Anti-Mensch-DOCK8	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	15 µl
Anti-Mensch-STAT1	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	15 µl
Anti-Mensch-ILK	Maus	Santa Cruz, Heidelberg	15 µl

3.3.3 Durchführung der Immunpräzipitation

3.3.3.1 Immunpräzipitation zur Identifikation von Septin 7 Interaktoren

Frisch präparierte, pelletierte Blutleukozyten eines Kontrollpferdes wurden in 100 µl Chaps-Lysepuffer je 3×10^6 Zellen aufgelöst und die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt (Kap. 3.2). Für alle Waschschrte wurde Waschpuffer mit Chaps-Lysepuffer verwendet. Für den eingesetzten anti-Septin 7-Antikörper Klon 19A4 und die Isotypkontrolle Ratte IgG2c wurden 40 µl 50 % Protein G Sepharose 4 Fast Flow Beads-Slurry¹⁹ in 1,5 ml Reaktionsgefäße²⁰ abgefüllt und dreimal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen (1800 rcf, 30 sec, RT). Anschließend erfolgte die Zugabe der eingesetzten Antikörper beziehungsweise von TBS (Negativkontrolle (Blank)) zu den gewaschenen Beads. Nach der darauf folgenden einstündigen Inkubation auf einem Rotationsrad bei 4°C wurden ungebundene Antikörper durch eine Zentrifugation (1000 rcf, 30 sec, 4°C) und zweimaliges Waschen mit je 500 µl Waschpuffer entfernt. Daraufhin erfolgte eine einstündige Inkubation mit 500 µl Blockierlösung bei 4°C auf dem Rotationsrad, um freie Bindungsstellen der Beads zu blockieren. Nach der Blockade, Zentrifugation

¹⁸ Standort Großhadern

¹⁹ GE Healthcare, Freiburg

²⁰ Eppendorf, Wessling-Berzdorf

(1000 rcf, 30 sec, 4°C) und zwei Waschschritten mit je 250 µl Waschpuffer wurde das einem Milligramm Protein entsprechende Zelllysativolumen 1:4 mit TBS verdünnt, zu den Beads gegeben und über Nacht mit diesen bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Der durch die anschließende Zentrifugation (1000 rcf, 2 min, 4°C) entstandene Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Beads erneut in drei Waschschritten mit je 150 µl Waschpuffer gewaschen. Danach folgten zwei weitere Waschschrritte, bei denen je 250 µl TBS verwendet wurde. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (1000 rcf, 2 min, 4°C) erfolgte die Elution des Präzipitats durch Zugabe von 60 µl reduzierendem 2 x Lämmli-Puffer und Inkubation auf dem Schüttler für 15 min bei Raumtemperatur (600 rpm) und für fünf Minuten bei 70°C. Die anschließende Zentrifugation bei 1000 rcf für zwei Minuten erlaubte das Abnehmen des eluierten Präzipitats, ohne die Beads dabei aufzuwirbeln. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Beads erneut für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit weiteren 40 µl des reduzierenden 2 x Lämmli-Puffers geschüttelt (600 rpm). Nach der abschließenden Zentrifugation (1000 rcf, 2 min, 4°C), wurde der Überstand mit dem, im vorherigen Schritt gewonnenen, Präzipitat gepoolt. Im Anschluss an die Elution wurden die gewonnenen Präzipitate mittels FASP-Verdau (Kap. 3.4.1) für die Analyse im Massenspektrometer vorbereitet.

3.3.3.2 Immunpräzipitation zur Verifikation der Septin 7 Interaktion mit DOCK8

Analog zu der im Kap. 3.3.3.1 beschriebenen Methode wurde eine weitere Immunpräzipitation zur Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion zwischen Septin 7 und DOCK8 durchgeführt (vgl. Kap. 4.1.). Zusätzlich zu dem anti-Septin-7-Antikörper und der Isotypkontrolle Ratte IgG2c wurden anti-DOCK8-Antikörper und die Isotypkontrolle Kaninchenserum für weitere Ansätze verwendet. Im Anschluss an die Elution erfolgte statt eines FASP-Verdaus die weitere Analyse im Western Blot.

3.3.3.3 Immunpräzipitation zur Untersuchung von DOCK8 Interaktoren

Auch hier fand, mit geringen Abweichungen, das in Kap. 3.3.3.1 beschriebene Protokoll Anwendung. Zusätzlich, zu dem im Kap. 3.3.3.1 verwendeten Ansatz, erfolgte wie im Kap. 3.3.3.2 beschrieben, die Verwendung des anti-DOCK8-Antikörpers und der Isotypkontrolle Kaninchenserum. Abschließend wurden die Eluate mittels FASP-Verdau auf die massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

3.3.3.4 Immunpräzipitation zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit Signaltransduktionsmolekülen bei gesunden und an ERU erkrankten Pferden

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 und DOCK8 erfolgte wie im Kapitel 3.3.3.1 und im Kapitel 3.3.3.2 die Verwendung des anti-Septin 7- und des anti-DOCK8-Antikörpers. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie im Kapitel 3.3.3.1 beschrieben.

3.3.3.5 Immunpräzipitation zur Verifikation der Interaktionspartner ILK und STAT1

Zur Verifikation der Interaktionen von Septin 7 und DOCK8 mit den Signaltransduktionsmolekülen ILK und STAT1, diente eine weitere Immunpräzipitation mit sieben verschiedenen Ansätzen, bei denen anti-Septin 7-, anti-DOCK8-, anti-ILK-, anti-STAT1-Antikörper und die Isotypkontrollen Ratte IgG2c, Kaninchen IgG und Maus IgG3 eingesetzt wurden. Die Immunpräzipitation erfolgte wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben. Im Anschluss an die Elution wurden die Proben im Western Blot analysiert.

3.4 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

Zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 (siehe Kap. 4.1) und DOCK8 (siehe Kap. 4.2) sowie zur Identifikation interagierender Signaltransduktionmoleküle (siehe Kap. 4.3) wurde, im Anschluss an die im Kap. 3.3.3 beschriebene Immunpräzipitation, eine Analyse mittels LC-MS/MS Massenspektrometrie durchgeführt.

3.4.1 FASP-Verdau der Immunpräzipitate

3.4.1.1 Puffer und Lösungen für den FASP-Verdau

TBS

TBS (Kap. 3.1.1).

100 mM DTT

DTT²¹ (100 mM) 15,42 mg

direkt vor Gebrauch in 1 ml HPLC-Wasser²² lösen.

Urea A (UA)-Puffer

Harnstoff²³ (8 M) 48,03 mg

1 M Tris-HCl pH 8,5 (100 mM) 100,00 µl

ad 1 ml HPLC-Wasser²².

300 mM Iodacetamid

2-Jodacetamid²³ (300 mM) 2,77 mg

direkt vor Gebrauch in 50 µl HPLC-Wasser²² lösen.

²¹ Serva, Heidelberg

²² Merck Millipore, Darmstadt

²³ GE Healthcare, Freiburg

Ammoniumbicarbonat (ABC)-Puffer

NH₄HCO₃ (50 mM) 19,75 mg
in 5 ml HPLC-Wasser²⁴ lösen.

Lys-C

Lysyl Endopeptidase²⁵ (0,2 mg/ml) 20,00 µg
in 100 µl HPLC-Wasser²⁴ lösen.

Trypsin

Trypsin²⁶ (0,5 mg/ml) 20,00 µg
in 40 µl HPLC-Wasser²³ lösen.

ABC-Puffer mit 2 % Acetonitril (ACN)

Acetonitril²⁷ (2%) 1,00 µl
ad 50 µl ABC-Puffer.

0,5 % TFA

99 % Trifluoressigsäure 15,00 µl
ad 3 ml HPLC-Wasser²⁴.

²⁴ Merck Milipore, Darmstadt

²⁵ Wako, Neuss

²⁶ Promega, Mannheim

²⁷ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.4.1.2 Durchführung des FASP-Verdaus

Die Eluate aus der Immunpräzipitation zur Identifikation von Septin 7- und DOCK8-Interaktoren (Kap. 3.3.2) wurden, zur Vorbereitung auf ihre massenspektrometrische Analyse, einem Filter-aided Sample Preparation (FASP)-Verdau unterzogen. Zunächst wurden die Proben im Verhältnis 1:4 mit TBS verdünnt. Es folgten die Zugabe von 10 µl 100 mM DTT²⁸ und eine 30-minütige Inkubation bei 60°C auf dem Schüttler (600 rpm). Anschließend wurden die Proben auf RT abgekühlt und mit je 100 µl UA-Puffer und 10 µl 300 mM Iodacetamid für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Währenddessen wurden 30 kDa Cut-off-Filter²⁸ mit ABC-Puffer vorgewaschen (14000 rcf, 5 min, RT). Die Proben wurden auf die angefeuchteten Filter gegeben und abzentrifugiert (14000 rcf, 15 min, RT). Die Durchläufe wurden verworfen und die Filter anschließend dreimal mit 200 µl UA-Puffer und zweimal mit 100 µl ABC-Puffer gewaschen, wobei die Durchläufe ebenfalls verworfen wurden. Danach erfolgte die Zugabe von je 50 µl ABC-Puffer und 5 µl Lys-C sowie, nach zweistündiger Inkubation bei RT, 4 µl Trypsin. Damit wurden die Filter bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 15 Minuten bei RT und 14000 rcf. Die Durchläufe, die nun die Peptide enthielten, wurden gesammelt (Durchlauf 1). Zuletzt wurden 20 µl ABC-Puffer mit 2 % ACN auf die Filter gegeben, erneut abzentrifugiert (14000 rcf, 15 min, RT) und der Durchlauf mit Durchlauf 1 zusammengeführt. Die so gewonnenen Eluate wurden mit 0,5 % TFA angesäuert und direkt für die LC-MS/MS verwendet.

²⁸ Serva, Heidelberg

3.4.2 LC-MS/MS

3.4.2.1 Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse

Puffer A

Acetonitril ²⁹ (2 %)	20,00 ml
Ameisensäure ²⁹ (0,1 %)	1,00 ml
ad 1000 ml HPLC-Wasser ³⁰ .	

Puffer B

Acetonitril ²⁹ (98 %)	980,00 ml
Ameisensäure ²⁹ (0,1 %)	1,00 ml
ad 1000 ml HPLC-Wasser ³⁰ .	

3.4.1.2 Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchung

Die Liquid-Chromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit der Research Unit Protein Science des Deutschen Forschungszentrums für Gesundheit und Umwelt in den Räumen des Helmholtz Zentrums München durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einem Ultimate3000 nano HPLC System³¹, welches mittels einer Nano Spray Ionenquelle online an ein LTQ OrbitrapXL³² Massenspektrometer gekoppelt ist. Das HPLC System ist mit einer Nano Trap Säule³¹ (100 µm i.d. x 2 cm, gepackt mit Acclaim PepMap 100 C18, 5 µm, 100Å Material) und einer analytischen Säule³¹ (75 µm i.d. x 15 cm, Acclaim PepMap 100 C18, 3 µm, 100Å Material) ausgestattet. Die Proben aus den Experimenten zu Septin 7-Interaktoren (vgl. Kap. 4.1.1) und den weiteren Untersuchungen zu DOCK8- und Septin 7-Interaktionen (Kap. 4. 2.; Kap. 4.3) wurden in getrennten Durchläufen analysiert. Zuerst erfolgte automatisch die Injektion der Proben und Ladung auf die Nano Trap Säule³¹ mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min in

²⁹ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

³⁰ Merck Millipore, Darmstadt

³¹ Dionex, Idstein

³² Thermo Scientific, Bonn

5 % Puffer B und 95 % Puffer A. Nach 5 Minuten wurden die Peptide von der Nano Trap Säule³⁰ eluiert und auf der analytischen Säule³³ aufgetrennt. Diese Auftrennung fand durch einen Gradienten von 5 – 50 % Puffer B bei einer Flussrate von 300 nl/min in einem Zeitraum von 140 Minuten statt. Restliche auf der Säule verbliebene Peptide wurden durch einen kurzen Gradienten von 50 – 100 % Puffer B innerhalb von fünf Minuten eluiert. Die Analyse der eluierten Peptide erfolgte direkt nach der Nano Spray Ionisierung in einem LTQ OrbitrapXL³⁴ Massenspektrometer. Dazu wurden die zehn intensivsten Peptidionen aus den Orbitrap MS Vorscans für die Fragmentanalyse in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Als Auswahlkriterien wurden eine Intensität von mindestens 100 sowie eine minimal doppelte Ladung des Peptides festgesetzt. Der Wert für die normalisierte Kollisionsenergie (CID) wurde auf 35 festgesetzt. Die Detektion, der sich daraus ergebenden Fragmente mit einer normalen Auflösung, erfolgte in der linearen Ionenfalle. Ein hochauflösendes MS-Spektrum mit einer Halbwertsbreite (*engl.* full width half maximum) von 60.000 und einer Massenbandbreite von 200 - 2000 Da wurde in der Orbitrap während der Fragmentanalyse aufgenommen. Jedes Ion, das für die Fragmentierung selektiert wurde, wurde 30 Sekunden lang durch dynamischen Ausschluss von einer erneuten Fragmentierung ausgeschlossen (dynamic exclusion).

³³ Dionex, Idstein

³⁴ Thermo Scientific, Bonn

3.4.2 Quantitative Auswertung mit Progenesis

Die quantitative Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Stefanie Hauck, Research Unit Protein Science, Helmholtz Zentrum München. Die durch das Masse/Ladungsverhältnis (m/z) und die Detektionszeit (t) der einzelnen Peptide erstellten Peptidkarten jeder Probe (MS-Spektren) sowie die zu den Peptiden aufgenommenen Fragmentspektren (MS/MS-Spektren) wurden in die Progenesis-Software³⁵ (Version 2.5) importiert und die Peptidkarten der einzelnen Proben miteinander verglichen. Um eine optimale Übereinstimmung der Peptidkarten verschiedener Proben zu erreichen, wurde die jeweils komplexeste Probe als Referenz ausgewählt und die anderen anhand von jeweils sechs manuell gesetzten Markierungen automatisch daran ausgerichtet. Einfach geladene Peptide oder Peptide mit einer Ladung von über sieben wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Nachdem die Proben über alle detektierten Peptide zueinander normalisiert waren, konnten die Spektren für die Datenbanksuche aus der Progenesis-Software³⁵ als Mascot Generic File (mgf) exportiert werden. Nachdem die Identifizierung der Peptide in Mascot³⁶ (Kap. 3.4.4) erfolgt war, wurden die Daten wieder in die Progenesis-Software³⁵ reimportiert. Abschließend wurden die identifizierten Peptide Proteinen zugeordnet und deren jeweilige Abundanz berechnet.

³⁵ Nonlinear Dynamics

³⁶ <http://www.matrixscience.com>

3.4.3 Datenbanksuche für die mittels LC-MS/MS identifizierte Peptide

Die aufgenommenen MS/MS-Spektren wurden zur Identifikation der Peptide über Mascot³⁷ (Matrix Science, Version 2.4.1) mit der Ensembl-Pferd-Datenbank³⁸ (Version 78, 2014) abgeglichen. Dabei wurde die Peptidtoleranz auf maximal 10 ppm und die Fragmentationstoleranz auf 0,6 Da festgesetzt. Für die Analyse der Fragmentspektren wurde eine Cystein-Carbamidomethylierung als feste beziehungsweise eine Oxidierung von Methionin und Deamidierung von Asparagin und Glutamin als variable Modifikationen angegeben. Hier wurde maximal eine nicht geschnittene Spaltstelle toleriert. Anhand der in Mascot³⁶ integrierten Decoy-Datenbanksuche erfolgte die Abschätzung der Falschpositivrate ((*engl.* False discovery rate, FDR) minimale Ionen-Punktzahl von 13 im Percolator Suchalgorithmus, $p < 0,01$)), die kleiner als 1 % gehalten wurde.

Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte der quantitativen LC-MS/MS Datenauswertung ist in folgender Grafik gezeigt (Abb. 3.1):

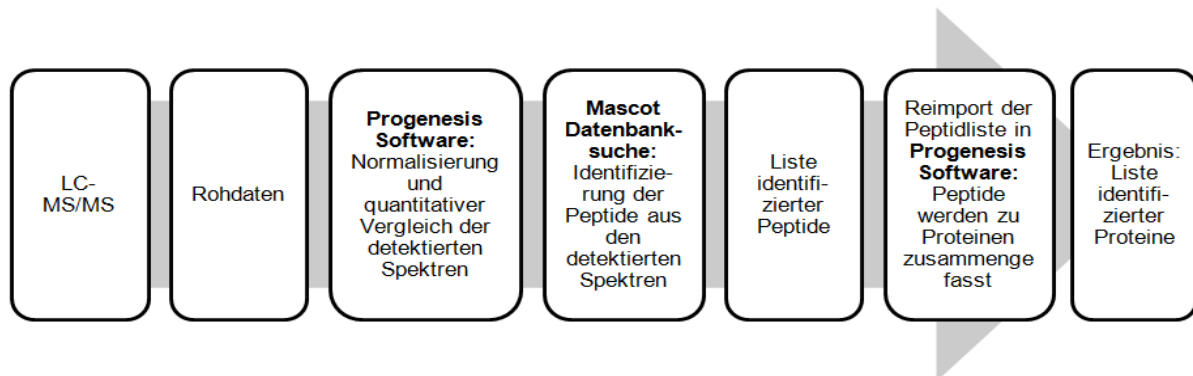


Abb. 3.1: Schema LC-MS/MS Datenauswertung; aus Lutterberg (2017).

³⁷ <http://www.matrixscience.com>

³⁸ http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index

3.4.5 Suche und funktionelle Analyse von Orthologen und Paralogen

Identifizierte equine Proteine, für die noch keine Namen oder Gensymbole vorhanden waren, wurden in der frei verfügbaren Ensembl-Pferd-Datenbank³⁹ (Version 78, 2014) entsprechenden Orthologen oder Paralogen zugeordnet. Falls dort keine passenden Einträge gefunden werden konnten, wurden für das Protein anhand der Proteinsequenz mit Hilfe des NCBI BLAST Algorithmus⁴⁰ homologe equine Sequenzen ausgewählt.

Bereits bekannte Interaktionen zwischen den humanen Orthologen von Genen der hier als Septin7-Interaktoren identifizierten Pferdeproteine wurden mittels der frei zugänglichen Software String 9.1⁴¹ identifiziert. Die identifizierten Proteine HCLS1 und DOCK8 waren nicht unter bereits bekannten Interaktionspartnern von Septin 7.

Alle verwendeten Datenbanken sind über das Internet zugänglich:

Ensembl: http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index

String: <http://string-db.org/>

³⁹ http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index

⁴⁰ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁴¹ <http://string-db.org/>

3.4.6 Auswertung der Proteinabundanzen

Zur Bewertung des Erfolgs der Septin7- und DOCK8-Interaktorenanreicherung mittels Immunpräzipitation, wurde für jedes identifizierte Protein der Quotient aus der Abundanz im jeweiligen Präzipitat zu der entsprechenden Abundanz im Präzipitat der Isotypkontrolle berechnet (Ratio). Erst ab einer Ratio ≥ 2 wurde die Anreicherung im Präzipitat des anti-Septin 7 bzw. des anti-DOCK8-Antikörpers als ausreichend gewertet und das entsprechende Protein für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen.

3.4.7 Einteilung der massenspektrometrisch identifizierten Protein in funktionelle Gruppen

Nachdem eine Selektion der Identifikationspartner durch die Auswertung der Proteinabundanzen (siehe Kap. 3.4.6) erfolgt war, wurden die interagierenden Proteine von DOCK8 (siehe Kap. 4.3.2) und Septin 7 (siehe Kap. 4.3.1) mit einer Ratio ≥ 2 anhand ihrer biologischen Funktionen in Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte mittels der frei zugänglichen Datenbank PANTHER classification system⁴² des GeneOntology Konsortiums⁴³.

⁴² <http://pantherdb.org/>

⁴³ <http://geneontology.org/>

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Fluoreszenzpuffer (Fluo-Puffer)

BSA ⁴⁴	5,00 g
Natriumazid	0,50 ml
ad 500 ml PBS.	
bei 4°C lagern.	

Permeabilisierungspuffer

BD Cytofix/Cytoperm⁴⁵, gebrauchsfertig

Waschpuffer für permeabilisierte Zellen

BD Perm/Wash ⁴⁵	5,00 ml
ad 50 ml Aqua bidest.	

PFA-Fixierlösung 4%

Paraformaldehyd ⁴⁶	40,0 g
ad 800 ml 1 x PBS	
Eine Stunde bei 60°C rühren	
Im Eisbad abkühlen lassen	
ad 160 ml 1 x PBS, pH-Wert auf 7,4 einstellen	

⁴⁴ Serva, Heidelberg

⁴⁵ Becton Dickinson, Heidelberg

⁴⁶ Merck, Darmstadt

3.5.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Equine PBL wurden, wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben, aufgetaut und mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) phänotypisiert.

Folgende primäre Antikörper fanden dabei Verwendung:

Antikörper	Produziert in	Herkunft	Verdünnung
Anti-Pferd-CD4	Maus	Serotec, Puchheim	1:100
Anti-Pferd-B-Zell leichte Kette	Maus	Dr. L. Göhring, Pferdeklinik der LMU München	1:10
Anti-Pferd-CD8 PE	Maus	Serotec, Puchheim	1:10
Anti-Mensch-DOCK8	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	1:10
Anti-Mensch-LckBP (HCLS1)	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:10
Anti-Mensch-STAT1	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	1:200

Folgende sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antikörper + Farbstoff	Produziert in	Herkunft	Verdünnung
Anti-Maus IgG1 PE	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
Anti-Maus IgG (H+L) PE	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
Anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa 488	Ziege	Invitrogen	1:400
Anti-Ziege IgG (H+L) Alexa 488	Esel	Invitrogen	1:400

Die Antikörper wurden in Fluopuffer beziehungsweise nach der Permeabilisierung in Waschpuffer für permeabilisierte Zellen verdünnt.

3.5.3 Fluoreszenzfärbung von equinen PBL für die Durchflusszytometrie

3.5.3.1 Einfachfärbung der PBL mit anti-DOCK8-, anti-HCLS1- und anti-STAT1-Antikörpern

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBL wurden zu je 2×10^5 Zellen in 100 µl PBS suspendiert und in die Dellen einer 96-Loch-Rundbodenplatte⁴⁷ pipettiert. Anschließend erfolgten ein Zentrifugationsschritt (4°C, 800 rcf, 10 sec) und ein kräftiges Dekantieren der Platte. Auf Eis wurden die verbleibenden Zellpellets mit 100 µl Permeabilisierungspuffer versetzt und nach einer 20-minütigen Inkubation in zwei Waschschritten mit je 200 µl Waschpuffer für permeabilisierte Zellen gewaschen (800 rcf, 10 sec, 4°C). Daraufhin wurden die Zellpellets für 30 Minuten mit 30 µl der jeweiligen Antikörperlösung inkubiert. Es erfolgten zwei weitere Waschschriffe mit 200 µl des Waschpuffers für permeabilisierte Zellen und eine 30-minütige Inkubation mit 30 µl des jeweiligen sekundären Antikörpers (siehe Liste sekundäre Antikörper Kap. 3.5.2) auf Eis. Ab dem Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden die Inkubationsschritte abgedunkelt durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgten zwei weitere Waschschriffe (800 rcf, 10 sec, 4°C) mit 200 µl Waschpuffer für permeabilisierte Zellen. Abschließend wurden die verbliebenen Zellpellets zur Fixation in 200 µl 1 % PFA in Fluopuffer suspendiert und bis zur Messung im FACS Canto II⁴⁸ gekühlt und abgedunkelt gelagert.

⁴⁷ Sarstedt, Nürnberg

⁴⁸ Becton Dickinson, Heidelberg

3.5.3.2 Doppelfärbung der PBL mit anti-DOCK8-, anti-STAT1-, anti-HCLS1-Antikörpern und den Lymphozytensubpopulationsmarkern

Auch bei der Durchführung der Doppelfärbungen wurden je 2×10^5 Zellen in PBS suspendiert und in die Dellen einer 96-Loch-Rundbodenplatte⁴⁹ überführt. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt erfolgte allerdings zunächst keine Permeabilisierung der Zellen, sondern die Färbung der Lymphozytensubpopulationsmarker. Dafür erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Zellpellets mit jeweils 30 µl der anti-CD4-, anti-CD8 PE- und anti B-Zell-Antikörper auf Eis. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit 200 µl Fluopuffer und die 30-minütige Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern. Auch hier wurden ab dem Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper alle weiteren Schritte abgedunkelt durchgeführt. Nach Zentrifugation (800 rcf, 10 sec, 4°C) und zwei weiteren Waschschrten mit Fluopuffer wurden die Zellen mit je 100 µl Permeabilisierungspuffer versetzt. Es folgten zwei Waschschrte mit 200 µl Waschpuffer für permeabilisierte Zellen. Analog zu der im Kapitel 3.5.3.1 beschriebenen Durchführung wurden die Zellen anschließend mit den anti-DOCK8-, anti-STAT1- und anti-HCLS1-Antikörpern inkubiert und abschließend mit den jeweiligen sekundären Antikörpern gefärbt. Auch hier erfolgte abschließend eine Fixation der Zellen mit 200 µl 1 % PFA in Fluopuffer. Für alle Färbungen wurden entsprechend Isotypkontrollen erstellt.

⁴⁹ Sarstedt, Nürnbergrecht

3.5.4 Detektion gefärbter Zellen mit dem Durchflusszytometer

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Proteinexpression von einzelnen Zellen und Zellpopulationen feststellen, die vorher mit einem Fluorochrom-markierten Antigen-spezifischen Antikörper gefärbt wurden. Der Prozentsatz der Zellen, die dieses Antigen exprimieren, bzw. die Expressionsstärke dieses Antigens kann somit für die getesteten Zellen ermittelt werden. In einer komplexen Probe wie Leukozyten können durch eine Doppelfärbung mit einem anders Fluorochrom-markierten Zellmarker auch einzelne Lymphozytensubpopulationen, wie zum Beispiel CD4⁺- oder CD8⁺-T-Helferzellen, analysiert werden.

Mit dem FACSCanto II⁵⁰ Immunzytometrie System können Tausende von Zellen pro Sekunde detektiert werden. Das System besteht aus einem Argonlaser (488 nm) und einer roten Laserdiode (633 nm) und kann über bestimmte Filter bis zu vier Farben gleichzeitig wahrnehmen. Der Grund dafür ergibt sich daraus, dass die zur Zellmarkierung genutzten Fluorochrome sich durch die gleiche Wellenlänge anregen lassen, jedoch unterschiedliche, Farbstoff-spezifische Emissionsspektren haben. Die fluoreszenzmarkierten PBL werden hierzu aus den Dellen in das Durchflusszytometer eingespeist und passieren durch hydrodynamische Fokussierung den gebündelten Argonlaserstrahl. Bei passender Wellenlänge werden die Elektronen der Fluorochrome auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen nach Beendigung der Anregung unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Diese Fluorochrom-spezifische Emission wird über einen Photodetektor (photomultiplier tube, PMT) mit optischem Filter registriert und in elektrische Impulse umgewandelt. Anschließend erfolgt eine graphische Darstellung der Impulse über einen Analog-Digital-Wandler, die zur weiteren Auswertung dient.

⁵⁰ Becton Dickinson, Heidelberg

3.5.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

In der FACSDiva Software⁵¹ wurden die detektierte Lymphozytenpopulation gegatet und die Bindung der eingesetzten Antikörper im Histogramm und im Dotplot dargestellt. Anhand des Histogramms, in dem eine Trennlinie den Graphen in zwei Bereiche teilt, lässt sich eine positive Fluorochrom-gekoppelte auf der rechten Seite von einer nicht-Fluorochrom-gekoppelten Population auf der linken Seite unterscheiden. Für die positive Population wurden die Werte des prozentualen Anteils (parent) aller Zellen, bei der eine Antikörper-Bindung detektiert wurde, im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ermittelt. Zusätzlich gab der geo Mean-Wert an, wie stark das getestete Antigen von den vorhandenen Zellen exprimiert wurde. In dieser Arbeit wurden zur Phänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen zunächst die parent-Werte verwendet. Anschließend wurden Expressionsanalysen der getesteten Proteine mit Hilfe des geo Means durchgeführt. Dafür wurden die jeweiligen geo Mean-Werte der Isotypkontrollen von den geo Mean-Werten der positiven Population abgezogen (=geo MFI), die das jeweilige Protein exprimiert. Alle Proben, die mit der FACSDiva Software⁵² nicht einheitlich gegatet werden konnten, wurden mithilfe der frei zugänglichen Flowing-Software⁵² einzeln nachgegatet und anschließend wie beschrieben ausgewertet.

⁵¹ Becton Dickinson, Heidelberg

⁵² Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, Finnland;
<http://flowingsoftware.com/index.php?page=33>

3.5.6 Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Für die Auswertung der in der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten wurden die geo MFI der Antigen-exprimierenden Populationen ermittelt. Für die Phänotypisierung von HCLS1 (n=5) und DOCK8 (n=13) in den Lymphozyten gesunder Pferde wurden die ermittelten geo MFI der jeweiligen Subpopulationen verglichen. Dabei diente auch hier ein vorangegangener KS-Test zur Feststellung der Normalverteilung. In beiden Fällen lag eine Normalverteilung vor, die eine weitere Anwendung des Student's *t*-Test implizierte. Für die Expressionsanalysen von HCLS1 in den PBL fünf gesunder und fünf an ERU erkrankter Pferde (vgl. Kap. 4.1.1.3) wurden die geo MFI der HCLS1 Expression in den getesteten CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen und in B-Zellen beider Gruppen verglichen. Dabei diente ein erneuter KS-Test zur Überprüfung der Normalverteilung. Da eine Normalverteilung vorlag, folgte die weitere Analyse mit dem Student's *t*-Test. Auch die Daten zur DOCK8 Expression in den PBL 13 gesunder und 12 an ERU erkrankten Pferden (vgl. Kap. 4.1.2.3), wurden auf diese Weise ausgewertet. Hier lag allerdings keine Normalverteilung vor, daher erfolgte die weitere Auswertung mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

3.6 Immunzytochemie

3.6.1 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie

Waschpuffer

PBS-Tween Lösung (PBS-T)

Tween-20 (0,05 %)	0,50 ml
ad 1000 ml PBS.	

Inkubationspuffer

BSA (1%)	0,5 g
ad 50 ml PBS-T	

Blockade-Puffer 1

Ziegenerum (5%)	50 µl
ad 1 ml Inkubationspuffer	

Blockade-Puffer 2

Eselserum (5 %)	50 µl
ad 1 ml Inkubationspuffer	

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

DAPI⁵³, gebrauchsfertig.

⁵³ Invitrogen, Karlsruhe

3.6.2 Antikörper für die Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden folgende kommerziell erhältliche primäre Antikörper eingesetzt:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-CD3ε	Ratte	monoklonal	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	pur
Anti-Mensch-DOCK8	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:100
Anti-Mensch-HCLS1	Ziege	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:100

Außerdem wurden folgende sekundäre Antikörper verwendet:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Ratte IgG (H+L) Alexa 568	Ziege	polyklonal	Invitrogen, Karlsruhe	1:500
Anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa 488	Ziege	polyklonal	Invitrogen, Karlsruhe	1:500
Anti-Ziege IgG (H+L) Alexa 488	Esel	polyklonal	Invitrogen, Karlsruhe	1:500

3.6.3 Immunzytochemische Färbung

Um das Expressionsmuster von DOCK8 und HCLS1 in equinen PBL von Kontrollpferden und an ERU erkrankten Pferden zu analysieren, wurden je circa 5×10^4 PBL auf einem Objektträger⁵⁴ ausgestrichen. Nach Fixierung für zehn Minuten in eiskaltem Aceton wurden die gut getrockneten Zellen in PBS-T rehydriert und die Ausstriche anschließend mit einer Lösung aus 5 % Ziegenserum und 1 % BSA in PBS-T bei RT für 40 min blockiert. Daraufhin folgte eine Inkubation mit dem primären unverdünnten Ratte-anti-CD3ε-Antikörper (Kleinwort et al., 2016) über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C. Nicht gebundener Antikörper wurde durch drei Waschschrte mit PBS-T entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in der feuchten Kammer über 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Ratte IgG inkubiert. Nach drei Waschschrten mit PBS-T

⁵⁴ Medite, Burgdorf

erfolgte eine Inkubation der Zellen mit anti-Mensch-DOCK8-Antikörper in der Verdünnung 1:100 über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C. Zur Doppelfärbung von CD3ε mit HCLS1 wurde vor Antikörper-Inkubation eine 40-minütige Blockade mit 5 % Eselserum in 1 % BSA in PBS-T durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem anti-Mensch-HCLS1-Antikörper bei 4°C in der feuchten Kammer über Nacht. Die primären Antikörper anti-DOCK8 und anti-HCLS1 wurden in drei Waschschritten mit PBS-T entfernt und die Zellen über 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Für die DOCK8-gefärbten Zellen erfolgte die Inkubation mit dem 1:500 in 1 % BSA in PBS-T verdünnten Ziege-anti-Kaninchen IgG -Antikörper. Die HCLS1-gefärbten Zellen wurden mit dem, 1:500 in 1 % BSA in PBS-T, verdünnten Esel-anti-Ziege IgG-Antikörper inkubiert. Auch hier wurden in drei folgenden Waschschritten mit PBS-T nicht gebundener Antikörper entfernt. Zur Kenntlichmachung der Zellkerne wurden die Zellen anschließend mit DAPI⁵⁵ (1:1000 in PBS-T mit 1 % BSA verdünnt) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Ausstriche mit Fluorescent Mounting Medium⁵⁶ eingedeckelt. Die Auswertung und Dokumentation des Bindungsmusters der Antikörper an PBL erfolgte mit dem Mikroskop Axio Imager M31⁵⁷ und der Software AxioVision⁵⁷ (Version 4.8.2).

⁵⁵ Invitrogen, Karlsruhe

⁵⁶ DAKO, Hamburg

⁵⁷ Carl Zeiss, Oberkochen

3.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.7.1 Puffer und Lösungen

3.7.1.1 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Acrylamid-Lösung

Acrylamide-Bis Lösung 33 %⁵⁸ , gebrauchsfertig.

Bromphenolblau-Lösung

Eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver⁵⁹ in Aqua bidest. lösen.

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung 10 %

APS (10 %) 0,10 g
in 1 ml Aqua bidest. lösen.

TEMED-Lösung

N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), gebrauchsfertig.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10 %

SDS (35 mM) 10,00 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen. Lösung bei RT lagern.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 20 %

SDS (70 mM) 20,00 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen. Lösung bei RT lagern.

⁵⁸ Serva, Heidelberg

⁵⁹ Sigma-Adrich, Taufkirchen

Gelpuffer, pH 8,8

Tris (1,5 M)	18,15 g
--------------	---------

in 100 ml Aqua bidest. lösen und pH 8,8 auf einstellen.

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris (0,5 M)	6,00 g
--------------	--------

in 100 ml Aqua bidest. lösen und pH auf 6,8 einstellen.

5x Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3

Tris (120 mM)	15,00 g
Glycin ⁶⁰ (960 mM)	72,00 g
SDS (0,05 %)	5,00 g

in 1000 ml Aqua dest. lösen und pH auf 8,3 einstellen.

Die Stammlösung wird für die Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

5x Laemmlipuffer (reduzierend)

1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (250 mM)	8,33 ml
20 % SDS-Lösung (5 %)	12,50 ml
Glycerin, wasserfrei (50 %)	25,00 ml
500 mM 2-Mercaptoethanol ⁶¹	1,75 ml

ad 50 ml Aqua bidest. und eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver⁶¹ hinzufügen.

Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

⁶⁰ Biomol, Hamburg

⁶¹ Sigma-Adrich, Taufkirchen

Abdichtgel

Aqua bidest.	400,00 µl
33 % Acrylamid-Lösung ⁶²	200,00 µl
10 % APS-Lösung	20,00 µl
TEMED-Lösung	2,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

Laufgel (10 % SDS Gel)

Aqua bidest.	4,20 ml
Gelpuffer, pH 8,8	2,50 ml
33 % Acrylamid-Lösung ⁶²	3,30 ml
10 % SDS-Lösung	100,00 µl
10 % APS-Lösung	50,00 µl
TEMED-Lösung	20,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

Sammelgel (4 % SDS Gel)

Aqua bidest.	6,17 ml
Sammelgelpuffer, pH 6,8	2,50 ml
33 % Acrylamid-Lösung ⁶²	1,33 ml
10 % SDS-Lösung	100,00 µl
Bromphenolblau-Lösung	100,00 µl
10 % APS-Lösung	90,00 µl
TEMED-Lösung	30,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

2-Propanol

2-Propanol (Isopropanol), gebrauchsfertig.

⁶² Serva, Heidelberg

3.7.1.2 Puffer und Lösungen für den Western Blot

Anodenpuffer I 0,3 M, pH 10,4

Tris	36,33 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Anodenpuffer II 25 mM, pH 10,4

Tris	3,03 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Kathodenpuffer, pH 9,4

Tris	3,03 g
e-Aminocaprinsäure	5,25 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Ponceau-Färbelösung

Ponceau-S (0,2 %) ⁶³	0,20 g
Trichloressigsäure (3 %)	3,00 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen.	

PBS-Tween Lösung (PBS-T)

Tween-20 (0,05 %)	0,50 ml
ad 1000 ml PBS.	

⁶³ Sigma-Adrich, Taufkirchen

1 % Polyvinylpyrrolidone-Tween Lösung (PVP-T), pH 7,2

Polyvinylpyrrolidone (PVP40)⁶⁴ (1 %) 1,00 g

in 100 ml PBS-T lösen.

ECL (Enhanced-Chemilumineszenz)-Lösung A

Tris (0,1 M) 2,42 g

Luminol⁶⁴ 50,00 mg

in 200 ml Aqua bidest. lösen, pH auf 8,6 einstellen.

Lagerung bei 4°C.

ECL-Lösung B

Para-Hydroxycoumarinsäure⁶⁵ 0,11 g

in 100 ml DMSO lösen.

Dunkel und bei RT lagern.

H₂O₂

H₂O₂ 30 %⁶⁵ , gebrauchsfertig.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

Lösung A 1,00 ml

Lösung B 0,10 ml

30 % H₂O₂ 3,00 µl

⁶⁴ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁶⁵ Merck Millipore, Darmstadt

3.7.2 Durchführung der 1D-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Auftrennung der Proteine in PBL-Lysaten von Kontroll- und ERU-Pferden nach ihrem Molekulargewicht, erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode durch Anlegen einer elektrischen Spannung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei laufen Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend unterschiedlich weit in ein SDS-Gel ein, wobei die größeren Proteine weiter oben im Gel abgefangen werden und kleinere Proteine tiefer in das Gel einlaufen. Die verwendeten Gele wurden in einer Mini Protean Tetra System Gießkammer⁶⁶ in einer Größe von 8 x 7 cm und einer Dicke von 1 mm gegossen. Um ein Auslaufen der Laufgele zu verhindern, wurden in die Kammern zuerst schnell härtende Abdichtgele gegossen. Darauf wurde dann das Laufgel eingefüllt und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Laufgels wurde das Isopropanol sorgfältig abgenommen und das Sammelgel darauf geschichtet. Um die Proben später auf das Sammelgel auftragen zu können und zudem mehrere Proben in einem Gel gleichzeitig aufzutrennen, wurde ein entsprechender Kamm zur Herstellung der Probentaschen in das noch flüssige Sammelgel eingefügt. Die aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Lämmli-Puffer verdünnt und im Thermomixer⁶⁷ (750 rpm) fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Um später die Bandenhöhe ablesen zu können, wurden in eine der vorgeformten Geltaschen 4 µl einer Markerprotein-Mischung (Serva Triple Color Protein Ladder⁶⁸) gegeben und in die restlichen Geltaschen jeweils die aufzutrennenden Proteine. Nach dem Überführen der ausgehärteten Gele in die Elektrophoresekammern und Befüllen mit Elektrophoresepuffer wurden die Kammern an das Power Pac Basic Power Supply⁶⁹ angeschlossen. Die Proben liefen bei RT mit 12,5 mA pro Gel in das Sammelgel ein, bis die Laufront das Laufgel erreicht hatte. Dann wurde die Ampèrezahl schrittweise auf 25 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Laufront am unteren Gelrand angekommen war.

⁶⁶ BioRad, München

⁶⁷ Eppendorf, Wessling-Berzdorf

⁶⁸ Serva, Heidelberg

⁶⁹ Bio-Rad, München

3.7.3 Durchführung des Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Semi-dry-Elektroblotter (PERFECTBLUE)⁷⁰ vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran⁷¹ überführt. Die Blot-Papiere⁷² und die PVDF-Membran⁷¹ wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und übereinander geschichtet. Auf die anodische Platte des Elektroblotters wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte Blot-Papiere und ein in Anodenpuffer II getränktes Blot-Papier gelegt. Dann wurde die zuvor in Methanol und Aqua bidest. getränkte PVDF-Membran und anschließend das SDS-Gel aufgelegt. Zuletzt wurden drei in Kathodenpuffer getränkte Blot-Papiere auf dem Gel platziert. Mit einer Glaspipette wurden vorsichtig sämtliche die Elektrophorese störenden Luftblasen ausgestrichen und anschließend die kathodische Platte des Elektroblotters aufgesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte mit Hilfe eines BP 500 Plus Power Supply⁷⁰ bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² und einer Transferzeit von 40 Minuten.

3.7.4 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung

Um den Proteintransfer auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurde die Membran zehn Minuten in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Die Ponceau S-Färbung weist eine Sensitivität von 250 – 500 ng Protein auf (Salinovich and Montelaro, 1986). Durch anschließendes Waschen in Aqua bidest. wurden die Proteinbanden durch Entfernen der Hintergrundfärbung sichtbar gemacht. Abschließend erfolgte die komplette Entfärbung der Membran durch Waschen in PBS-T.

⁷⁰ Serva, Heidelberg

⁷¹ GE Healthcare, Freiburg

⁷² Roth, Karlsruhe

3.7.5 Immunoblot

Im Anschluss an die Ponceau-Färbung wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 4 % BSA in PBS-T blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen in zehn Minuten-Intervallen mit PBS-T wurden die Membranen mit Antigen-spezifischen primären Antikörpern in passender Verdünnung inkubiert. Sollten mehrere Antikörper auf einer Membran getestet werden, wurden die Membranen entsprechend zugeschnitten. Die primären Antikörper verblieben über Nacht bei 4°C zur Inkubation auf den Membranen. Nach erneutem Waschen für dreimal 10 min mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase (POD)-konjugierten sekundären Antikörper in PBS-T für 60 min bei RT. Überschüssiger, nicht spezifisch an den primären Antikörper gebundener sekundärer Antikörper wurde durch sechs Waschschrte in 10-Minuten-Intervallen mit PBS-T entfernt. Die Lumineszenz der POD-markierten Proteine wurde anhand von ECL detektiert. Dafür wurden die Membranen für 2 min bei RT in der frisch angesetzten ECL-Lösung (siehe Kapitel 3.7.1.2) inkubiert und in eine Röntgenkassette eingelegt. Die Röntgenfilme (Euromed Plus green sensitive⁷³) wurden je nach Intensität der Signale zwischen 15 Sekunden und 15 Minuten belichtet und anschließend entwickelt. Die Blotmembranen wurden zum Entfernen der ECL-Lösung in Aqua bidest. gewaschen und konnten zur Reinkubation bei 4°C in PBS-T aufbewahrt werden.

⁷³ Christiansen, Planegg

Als primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit für den Immunoblot folgende kommerziell erhältliche primäre Antikörper verwendet:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Mensch-DOCK8	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:1000
Anti-Mensch-STAT1	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:1000
Anti-Mensch-pSTAT1 (Tyr701)	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Darmstadt	1:500
Anti-Mensch-ILK	Maus	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:1000
Anti-Septin 7	Maus	monoklonal	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	pur

Als sekundäre Antikörper fanden folgende POD-gelabelte Antikörper Verwendung:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG POD	Ziege	polyklonal	Cell Signaling, Darmstadt	1:5000
Anti-Maus IgG POD	Ziege	polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:5000
Anti-Maus IgG 2a POD	Ratte	monoklonal	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:1000

3.7.5 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurden die Western Blots zur Expressionsbestimmung von DOCK8 (vgl. Kap. 4.1.2.3), STAT1 (vgl. Kap. 4.5.1), pSTAT1 (vgl. Kap. 4.5.2) und ILK (vgl. Kap. 4.5.3) in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde statistisch ausgewertet. Für die Auswertung der im Western Blot detektierten Intensitäten wurden die Schwärzungsgrade der Banden mit Hilfe der frei zugänglichen ImageJ 1.47⁷⁴Software quantifiziert. Eine intensivere Schwärzung entsprach dabei einer stärkeren Expression des detektierten Proteins in der jeweiligen Probe. Die ermittelten Werte der beta-Aktin-Expression wurden mit den Intensitäten der jeweiligen Proteinexpressionen ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurden alle ermittelten Faktoren der Kontroll-PBL und der ERU-PBL mittels eines Kolmogorov-Smirnov Test (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS: $\geq 0,05$) wurde der Student's *t*-Test zur Auswertung herangezogen. Bei nicht normalverteilten Werten (KS: $\leq 0,05$) fand der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test Verwendung. In beiden Tests wurden alle Werte mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Eine Signifikanz konnte in den Kap. 4.1.2.3 und Kap. 4.5.3 festgestellt werden.

⁷⁴ <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>

4 ERGEBNISSE

4.1. Identifikation von Hematopoietic cell specific Lyn substrate 1 und Dedicator of cytokinesis 8 als potenzielle Septin 7-Interaktoren

Septin 7 gehört zur Familie der zytoskelettalen GTPasen und wird mit umfassenden Funktionen in zellulären Prozessen beschrieben. So spielt das Protein eine bedeutende Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmembran (Tooley et al., 2009). Die von uns bereits beschriebene Expressionsminderung von Septin 7 bei an ERU erkrankten Pferden (Degroote et al., 2014) könnte aufgrund der zahlreichen wichtigen Funktionen des Proteins eine bedeutende Rolle für die Pathogenese der ERU spielen. Um die Funktion von Septin 7 in Pferdezellen näher zu charakterisieren, war es Ziel dieser Arbeit, die Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 und anderen differentiell exprimierten Proteinen im equinen Lymphozytenproteom zu untersuchen. Besonders interessant waren für uns die Interaktionen zwischen Septin 7 und anderen Struktur- und Signaltransduktionsproteinen. Koordinierte Protein-Protein-Interaktionen zwischen Signaltransduktionsmolekülen spielen unter anderem bei der Immunreaktion eine essentielle Rolle. Bisher wurden Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 vor allem in Zelllinien untersucht, in die Plasmide mit humanem Septin 7 aus einer cDNA-Bibliothek transfiziert wurden (Nakahira et al., 2010). Außerdem sind im Rahmen von Studien zur diabetischen Nephropathie Untersuchungen zur Interaktion des Proteins in humanen und murinen Podozyten durchgeführt worden (Wasik et al., 2012, Wasik et al., 2017). Da aber bisher keine Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit Septin 7 in nativen Leukozyten beschrieben wurde, waren die hier durchgeführten Untersuchungen bei Pferde-PBL die ersten (PubMed-Recherche, Januar 2017). Es war zunächst das Ziel, die Interaktionen des Proteins in den peripheren Blutleukozyten (PBL) gesunder Pferde zu analysieren. Mittels Immunpräzipitation und nachfolgender Massenspektrometrie (LC-MS/MS) konnten insgesamt 73 Septin 7-Interaktorproteine identifiziert werden. Neben aus anderen Modellen und Spezies bereits bekannten Septin 7-Interaktoren, wie Septin 2, Septin 6 oder Septin 11 (Nakahira et al., 2010), wurden 47 weitere, noch nie vorher

beschriebene Septin 7-Interaktorproteine in equinen PBL detektiert. Unter den identifizierten Interaktionspartnern waren interessante Struktur- und Signalproteine, die bei anderen Spezies mit umfassenden Funktionen im Immunsystem assoziiert werden. Darunter wurden Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 (HCLS1) und Dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) zu einer näheren Charakterisierung ausgewählt (siehe Tab. 4.1).

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Number ^C	Ratio ^D
1	Dedicator of cytokinesis 8	ENSECAP00000010583	32,2
2	Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	ENSECAP00000013412	8,6

Tab. 4.1: Auswahl von signalübertragenden Kandidatenproteinen, die unter den 73 identifizierten Interaktionsproteinen von Septin 7 detektiert wurden und mit Funktionen im Immunsystem assoziiert sind. A: Fortlaufende Nummerierung; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>); D: Verhältnis der Abundanz des Proteins im Septin 7-Präzipitat im Vergleich zum Präzipitat der entsprechenden Isotypkontrolle rat IgG 2c (Ratio).

Weder HCLS1 noch DOCK8 wurden bisher bei Pferdelymphozyten beschrieben, so dass ihre Verteilung und Funktion dort bislang unbekannt waren (PubMed-Recherche: Stand 18. Januar 2017). Bei Maus und Mensch konnte aber gezeigt werden, dass HCLS1 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Immunzellen spielt, indem es als Substrat bei der Phosphorylierung im Zuge der B- und T-Zellaktivierung dient (Yamanashi et al., 1993, Carrizosa et al., 2009). Außerdem spielt das F-Aktin-Bindungsprotein HCLS1 in der Maus als Aktin-regulierendes Adaptorprotein an der immunologischen Synapse eine bedeutende Rolle (Gomez et al., 2006). DOCK8 gehört zur Familie der DOCK180 Proteine und fungiert als Guanin-Nukleotid-Exchange Faktor, der kleine GTPasen wie CDc42 aktiviert (Harada et al., 2012). Es ist an wichtigen zellulären Prozessen, wie der Organisation des Zytoskeletts (Janssen et al., 2016) und der Zellmigration (Shiraishi et al., 2016), beteiligt. Zusätzlich wird das Protein seit einigen Jahren aufgrund seiner Beteiligung an Immunprozessen intensiv erforscht. Beim Menschen führt eine ausbleibende DOCK8-Expression zu einem kombinierten Immundefekt, dem autosomal rezessiven Hyper-IgE-Syndrom (AD-HIES) (Engelhardt et al., 2009).

Die Erkrankung ist unter anderem durch rezidivierende Haut- und Atemwegsinfektionen gekennzeichnet (Zhang et al., 2009). Außerdem konnte bei Maus und Mensch gezeigt werden, dass eine verminderte Expression dieses Proteins zu morphologischen und funktionellen Defekten in Leukozyten führt (Tangye et al., 2016, Zhang et al., 2014). Aufgrund der zahlreichen interessanten Funktionen von HCLS1 und DOCK8 erfolgte im Zuge dieser Arbeit eine nähere Charakterisierung beider Proteine in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde.

4.1.1 Charakterisierung des Interaktorproteins HCLS1 in equinen PBL

4.1.1.1 Phänotypisierung von HCLS1 in equinen PBL

Um die Expression von HCLS1 in equinen Blutzellen zu phänotypisieren, erfolgten zunächst durchflusszytometrische Analysen zur HCLS1-Expression in Leukozyten gesunder Pferde. Das Protein konnte in allen Zellen detektiert werden. Hinsichtlich der Expressionsstärke von HCLS1 in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten ergaben sich Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen. Die geo MFI in den Monozyten fiel am höchsten aus, während die Expression von HCLS1 in Granulozyten und Lymphozyten ähnlich stark war. Da Lymphozyten für die Pathogenese der ERU eine bedeutende Rolle spielen, war für uns die HCLS1-Expression in den unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen von besonderem Interesse. Durch eine Doppelfärbung mit den jeweiligen Zellmarkern konnte die Expression von HCLS1 in CD4⁺-(vgl. Abb. 4.1 B) und CD8⁺- T-Zellen (vgl. Abb.4.1 C) sowie in B-Zellen (vgl. Abb.4.1 D) analysiert werden. Das Protein wurde in allen Lymphozyten exprimiert (siehe Abb. 4.1).

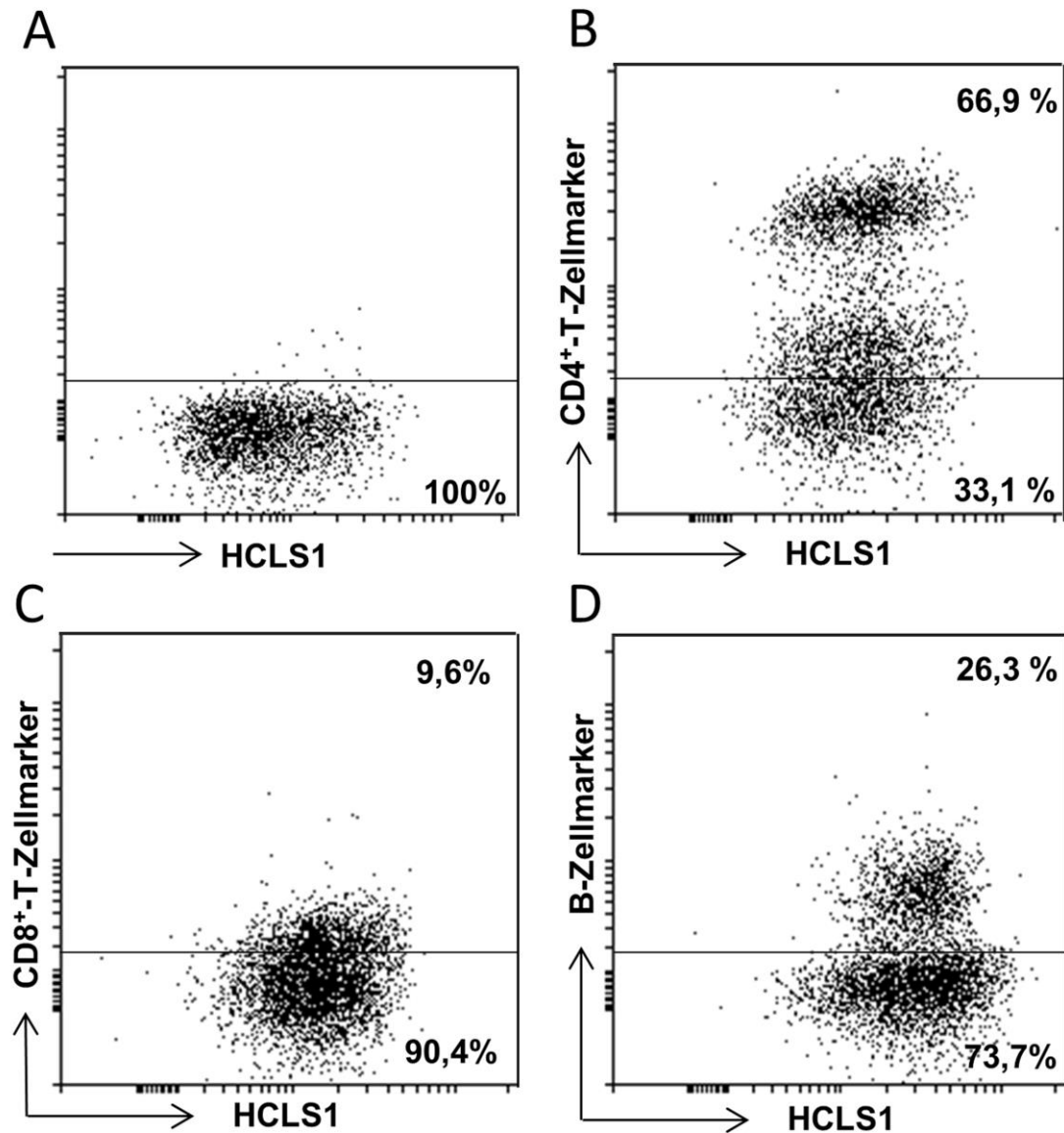


Abb. 4.1: Expression von HCLS1 in unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen.

Die Expressionsstärke von HCLS1 in den PBL gesunder Pferde wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt und ist repräsentativ im Dotplot dargestellt. Dargestellt sind alle Zellen, die sich innerhalb des Lymphozytengates befinden. Im unteren Abschnitt sind einfach positive Zellen dargestellt, im oberen Abschnitt Zellen, die sowohl das jeweilige Markerantigen exprimieren als auch HCLS1. Die Einfachfärbung (A) mit einem anti-HCLS1-Antikörper bestätigt die Expression des Proteins in allen Lymphozyten innerhalb des Gates. Die Dotplots B-D zeigen die Verteilung der HCLS1-Expression in den CD4⁺ T-Zellen (B) und den CD8⁺ T-Zellen (C) sowie in B-Zellen (D).

Hinsichtlich der Expressionsstärke im geometrischen Mittel (geo mean fluorescence intensity (geo MFI)) konnten Unterschiede zwischen CD4⁺- T-Zellen, CD8⁺- T-Zellen und B-Zellen festgestellt werden. Während die Expressionsstärke von HCLS1 in CD4⁺-T-Zellen und in CD8⁺-T-Zellen vergleichbar war, gab es eine Abweichung zu der Expressionsstärke in B-Zellen. Hier wurde HCLS1 1,5-fach stärker als in den CD4⁺-T-Zellen (nicht signifikant), beziehungsweise 1,7-fach stärker als in den CD8⁺-T-Zellen exprimiert (nicht signifikant) (Abb. 4.2).

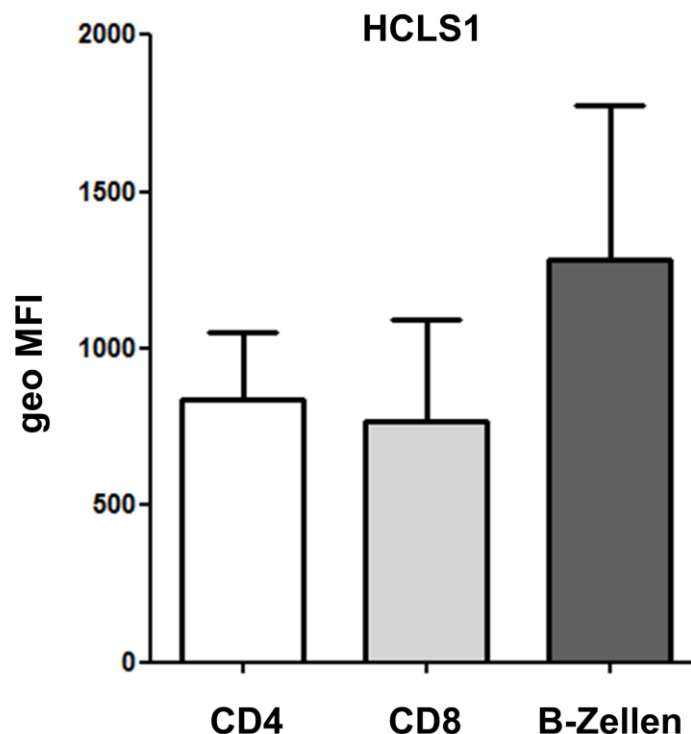


Abb. 4.2: Phänotypisierung der HCLS1 Expression bei Lymphozytensubpopulationen gesunder Pferde. Mittels Durchflusszytometrie wurden Expressionsunterschiede bei CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen analysiert. Die geo MFI Werte der HCLS1 Expression auf den PBL von gesunden (n=5) Tieren wurden statistisch ausgewertet. Während zwischen der Expressionsstärke in den CD4⁺-T-Zellen und den CD8⁺-T-Zellen kein Unterschied bestand, konnte eine Abweichung der Expressionsstärke in B-Zellen festgestellt werden. Die geo MFI der B-Zellen war im Vergleich zu den CD4⁺-T-Zellen 1,5-fach erhöht (nicht signifikant). Im Vergleich zu den CD8⁺-T-Zellen lag sie sogar 1,7-fach höher (nicht signifikant).

4.1.1.2 Differentielle Expression von HCLS1 in den Lymphozyten an ERU erkrankter Pferde

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte eine Expressionsminderung von Septin 7 in den PBL an ERU erkrankter Pferde im Vergleich zu gesunden PBL festgestellt werden (Degroote et al., 2014). Die differentielle Expression dieses Proteins könnte einen entscheidenden Faktor für die Pathogenese der ERU darstellen. Da HCLS1 ebenfalls mit wichtigen Funktionen für die Immunantwort assoziiert wird und mit Septin 7 interagiert, wollten wir wissen, ob HCLS1 auch bei PBL von an ERU erkrankten Pferden differenziell exprimiert ist. Um Expressionsunterschiede beider Phänotypen feststellen zu können, wurden Lymphozyten gesunder (n=5) und an ERU erkrankter (n=5) Pferde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Untersuchung der Expressionsstärke von HCLS1 in den PBL gesunder und erkrankter Pferde ergab sich eine signifikant 1,9-fach stärkere Expression in den Lymphozyten erkrankter Pferde (Abb. 4.3).

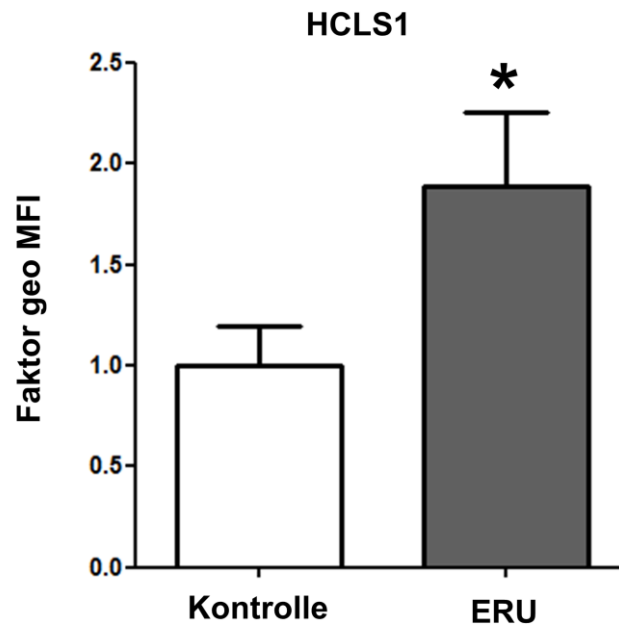


Abb. 4.3: Nachweis einer differentiellen Expression von HCLS1 in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Tiere mittels Durchflusszytometrie. Die geo MFI von HCLS1 in Lymphozyten gesunder (n=5) und erkrankter (n=5) Tiere wurde in der Durchflusszytometrie detektiert und statistisch ausgewertet. Die Werte der Kontrolltiere (weiße Säule) wurden gleich dem Faktor 1 gesetzt und die Werte der an ERU erkrankten Pferde (graue Säule) vergleichend aufgestellt. HCLS1 wird in den Lymphozyten erkrankter Pferde signifikant (* $p \leq 0,05$) 1,9-fach stärker exprimiert, als in den PBL der gesunden Tiere.

Da nun vor allem von Interesse war, bei welchen Lymphozytensubpopulationen diese Unterschiede vorliegen, wurde die Expressionsstärke von HCLS1 erneut unter zusätzlicher Verwendung von CD4⁺-T-Zell-, CD8⁺-T-Zell- und B-Zellmarkern bestimmt. Während bei den CD4⁺-T-Zellen keine Expressionsunterschiede feststellbar waren, konnten bei den CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen erhebliche Unterschiede zwischen den PBL gesunder und erkrankter Pferde detektiert werden. In den B-Zellen zeigte sich die differentielle Regulation von HCLS1 am deutlichsten. Hier wurde das Protein bei den erkrankten Tieren 2,1-fach stärker exprimiert als bei den getesteten Kontrolltieren (vgl. Abb. 4.4).

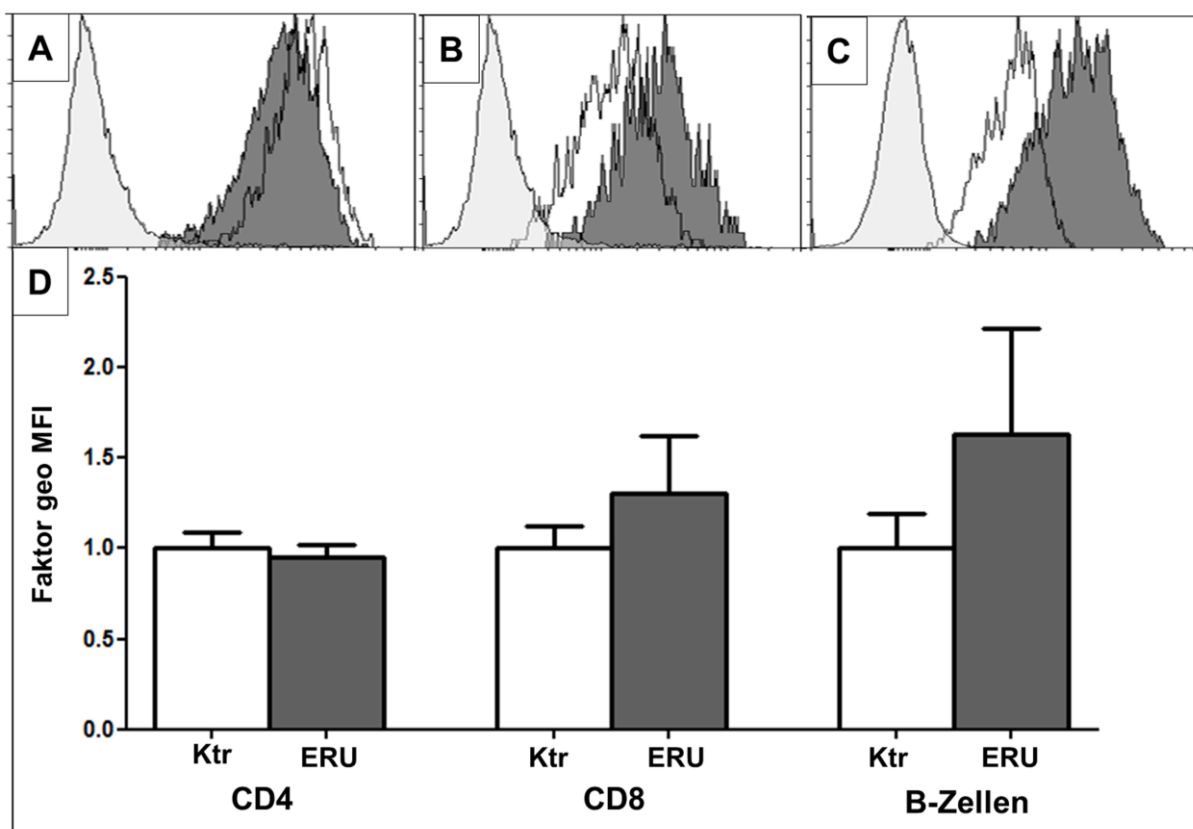


Abb. 4.4: Darstellung der HCLS1-Expression bei den Lymphozytensubpopulationen gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Die Histogramme (A-C) veranschaulichen repräsentativ die differentielle Regulation der Expression von HCLS1 in den Lymphozyten gesunder (weiß) und erkrankter (dunkelgrau) Pferde. A: CD4⁺-T-Zellen; B: CD8⁺-T-Zellen; C: B-Zellen. Die jeweiligen Isotypkontrollen sind vergleichend abgebildet (hellgrau). Die Auswertung (D) der geo MFI gesunder (n=5) und erkrankter (n=5) Pferde ergab keine signifikanten Unterschiede.

4.1.1.3 Charakterisierung des Verteilungsmusters von HCLS1 in den peripheren Blutlymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde

Mittels Immunzytochemie erfolgte eine Analyse des Verteilungsmusters von HCLS1 in den T- und B- Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Die Lokalisation von HCLS1 in Pferdelymphozyten war bisher unbekannt. Mit dem Ziel das Expressionsmuster von HCLS1 näher zu charakterisieren und damit die Funktion des Proteins in der Zelle weiter zu untersuchen, wurde die Verteilung von HCLS1 in peripheren Blutlymphozyten gesunder Pferde immunzytochemisch dargestellt (vgl. Abb. 4.5). Dabei wurden T- und B-Lymphozyten differenziert betrachtet. In T-Lymphozyten lag ein intrazelluläres Verteilungsmuster marginal um den Zellkern vor. In B-Zellen war hingegen eine diffuse Verteilung des Proteins erkennbar. Das physiologische Expressionsmuster des Proteins wurde mit dem von PBL an ERU erkrankter Pferde verglichen. Interessant war für uns, ob ein differentielles Verteilungsmuster oder Unterschiede in der Expressionsstärke detektiert werden können. Wie auch in den T-Zellen gesunder Pferde wurde HCLS1 in den T-Zellen erkrankter Pferde randständig am Zellkern nachgewiesen. Hinsichtlich der Expressionsstärke war kein Unterschied zur physiologischen Expression in den T-Zellen erkennbar. Auch in den B-Zellen gab es im Verteilungsmuster keinen Unterschied zwischen den PBL gesunder und erkrankter Pferde. In der Expressionsstärke jedoch konnte eine Abweichung festgestellt werden. HCLS1 wurde in den B-Zellen der an ERU erkrankter Pferde verstärkt exprimiert.

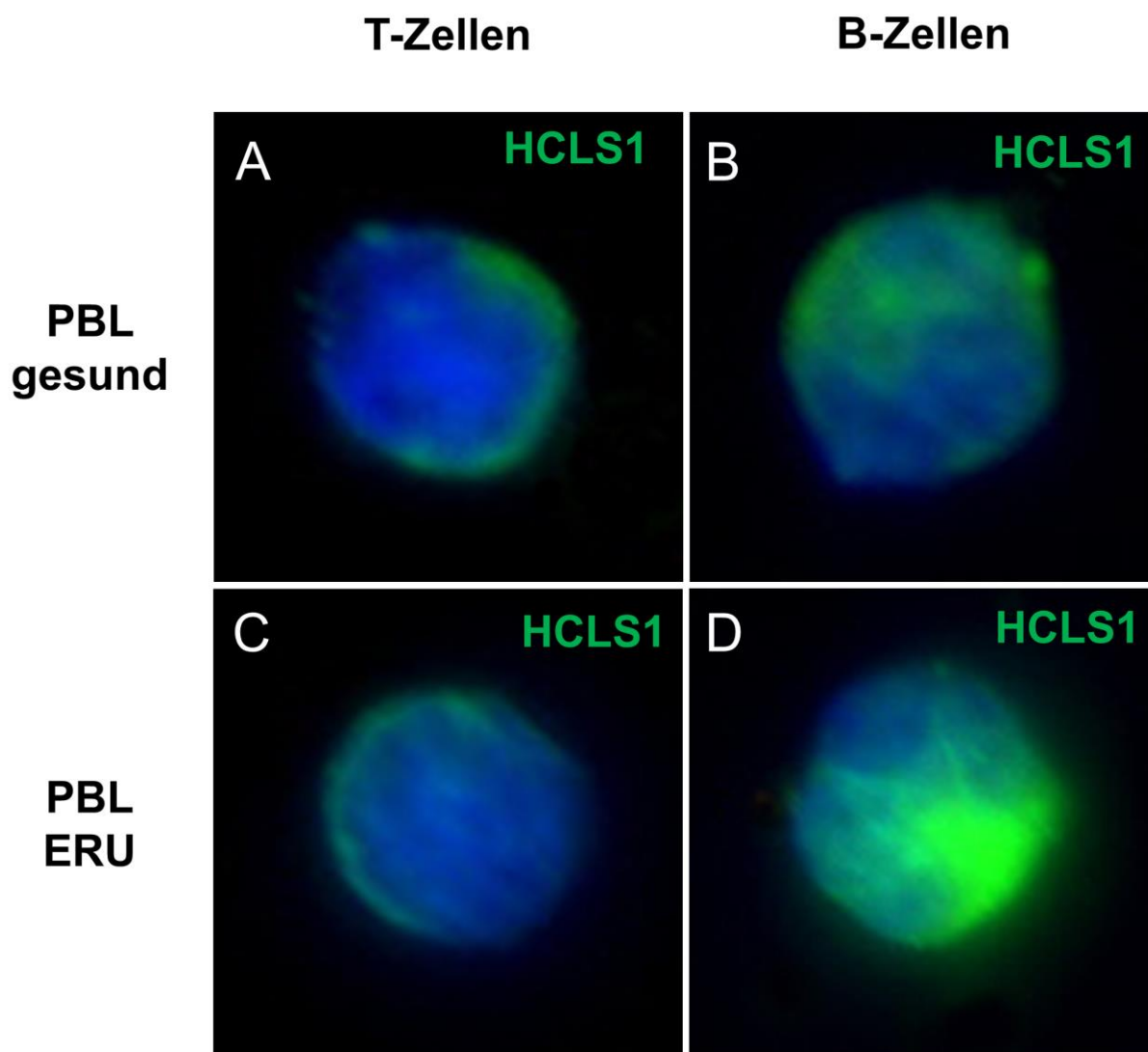


Abb. 4.5: Repräsentative Darstellung der HCLS1 Expression in den T- und B-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde in der Immunzytochemie. HCLS1 (grün) wurde in allen Lymphozyten exprimiert. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt. HCLS1 (grün) war in den T-Zellen gesunder Pferde (A) marginal am Zellkern lokalisiert, die Verteilung in den B-Zellen war diffus (B). Zwischen der physiologischen Expression in den T-Zellen und der Expression in den T-Zellen erkrankter Pferde (C) lag kein Unterschied vor. In den B-Zellen an ERU erkrankter Pferde (D), lag zwar das gleiche Verteilungsmuster vor wie in den B-Zellen gesunder Pferde, jedoch wurde das Protein verstärkt exprimiert.

4.1.2 Charakterisierung des Interaktionspartners DOCK8

DOCK8 ist neben HCLS1 ein weiteres Protein, das bisher nicht in Pferdezellen beschrieben wurde (PubMed-Recherche: Januar 2017). Durch die aus anderen Modellen bekannten Funktionen von DOCK8 im Immunsystem, war eine nähere Charakterisierung des Proteins von besonderem Interesse. Da die ERU eine T-Zell-medierte Erkrankung ist und Lymphozyten bei der Pathogenese eine bedeutende Rolle spielen (Degroote et al., 2017, Deeg et al., 2001) erfolgten weitere Untersuchungen zur Expression von DOCK8 in equinen PBL.

4.1.2.1 Verifikation der Interaktion zwischen Septin 7 und DOCK8

Zunächst sollte die massenspektrometrisch nachgewiesene Interaktion der beiden Proteine Septin 7 und DOCK8 mittels einer erneuten Immunpräzipitation verifiziert werden. Neben der Detektion von DOCK8 im Septin 7-Immunpräzipitat war für uns von Interesse, ob auch ein umgekehrter Nachweis der Interaktion gelingt. Dementsprechend erfolgte auch eine Untersuchung des Immunpräzipitats mit einem anti-DOCK8-Antikörper auf die Ko-Präzipitation von Septin 7 im Eluat. Mittels Western Blot gelang die Verifikation der Protein-Protein-Interaktion zwischen Septin 7 und DOCK8. DOCK8 konnte eindeutig, sowohl im Immunpräzipitat des anti-Septin 7-Antikörpers, als auch in einem nativen PBL-Lysat des gleichen Tieres, detektiert werden (vgl. Abb. 4.6 A). Das bestätigte sowohl die Interaktion mit Septin 7 als auch die Expression des Proteins in den PBL gesunder Pferde. Als weitere Kontrolle wurde getestet, ob diese Interaktion auch umgekehrt nachweisbar ist. Deshalb erfolgte die Untersuchung der Ko-Präzipitation von Septin 7 im DOCK8-Eluat. Es gelang ein eindeutiger Nachweis von Septin 7 im Immunpräzipitat des anti-DOCK8-Antikörpers (Abb. 4.6 B). Die Protein-Protein-Interaktion beider Moleküle galt somit als bestätigt.

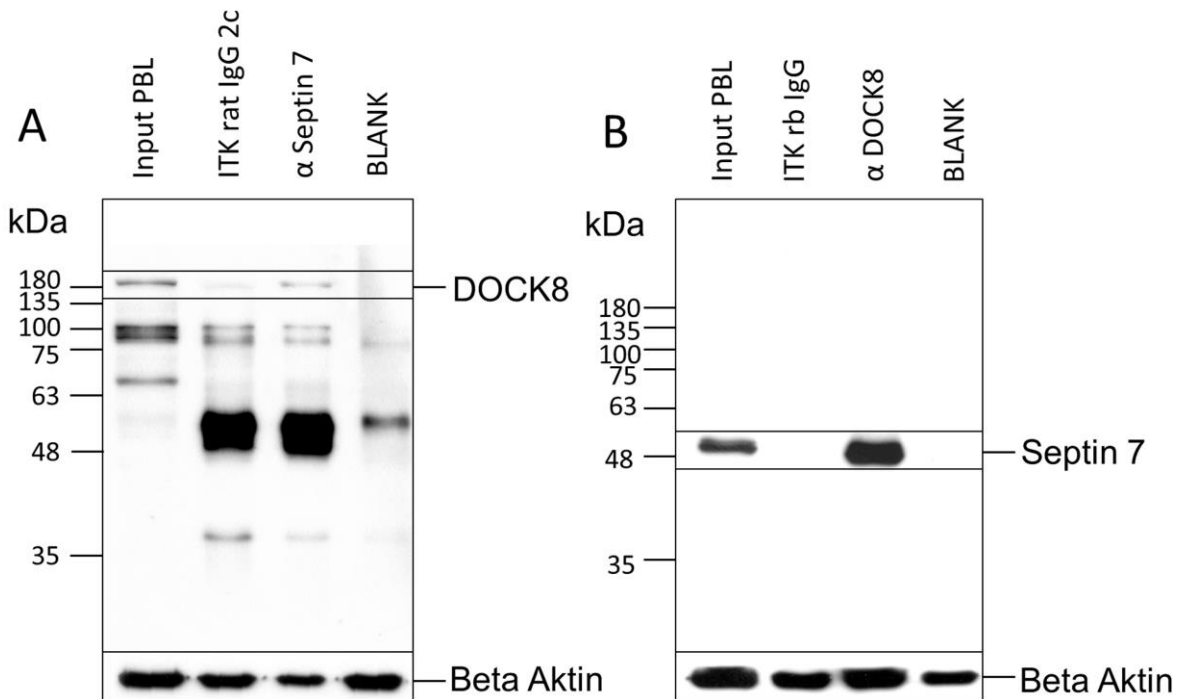


Abb. 4.6: Rückwärts-IP Blot zur Verifikation der Interaktion zwischen Septin 7 und DOCK8. Nach einer vorangegangenen Immunpräzipitation (IP) konnte der mit DOCK8 ko-präzipitierte Interaktionspartner Septin 7 im Immunpräzipitat des anti-DOCK8-Antikörpers im Western Blot detektiert werden (A). Auch der mit Septin 7 ko-präzipitierte Interaktionspartner DOCK8 wurde im Immunpräzipitat des anti-Septin 7-Antikörpers nachgewiesen (B). Im PBL-Lysat (Input) des gleichen gesunden Pferdes konnte sowohl Septin 7 als auch DOCK8 detektiert werden. In den Immunpräzipitaten der Isotypkontrollen (ITK rabbit IgG (ITK rb IgG) für DOCK8; ITK rat IgG 2c für Septin 7) und im BLANK konnte keines der beiden Proteine nachgewiesen werden.

4.1.2.2 Phänotypisierung von DOCK8⁺ Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

Eine Phänotypisierung von DOCK8 bei PBL gesunder Pferde sollte klären, von welchen Zellen das Protein exprimiert wird. Mittels Durchflusszytometrie konnte das Protein in den Leukozyten gesunder Pferde mit einer Expression von 100 % identifiziert werden. Sowohl in Monozyten, in Granulozyten und in den Lymphozyten wurde DOCK8 detektiert. Während die Expressionsstärke in Monozyten und Granulozyten ähnlich stark ausfiel, wurde das Protein in den Lymphozyten tendenziell schwächer exprimiert. Besonders interessant war für uns die Expression des Proteins in Lymphozyten, da T-Zellen in der Pathogenese der ERU eine bedeutende Rolle spielen. Um feststellen zu können, in welchen Lymphozytensubpopulationen DOCK8 beim Pferd exprimiert wird, wurden PBL gesunder Pferde mittels Durchflusszytometrie weiter phänotypisiert. Das Protein konnte in allen CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen detektiert werden (Abb. 4.7).

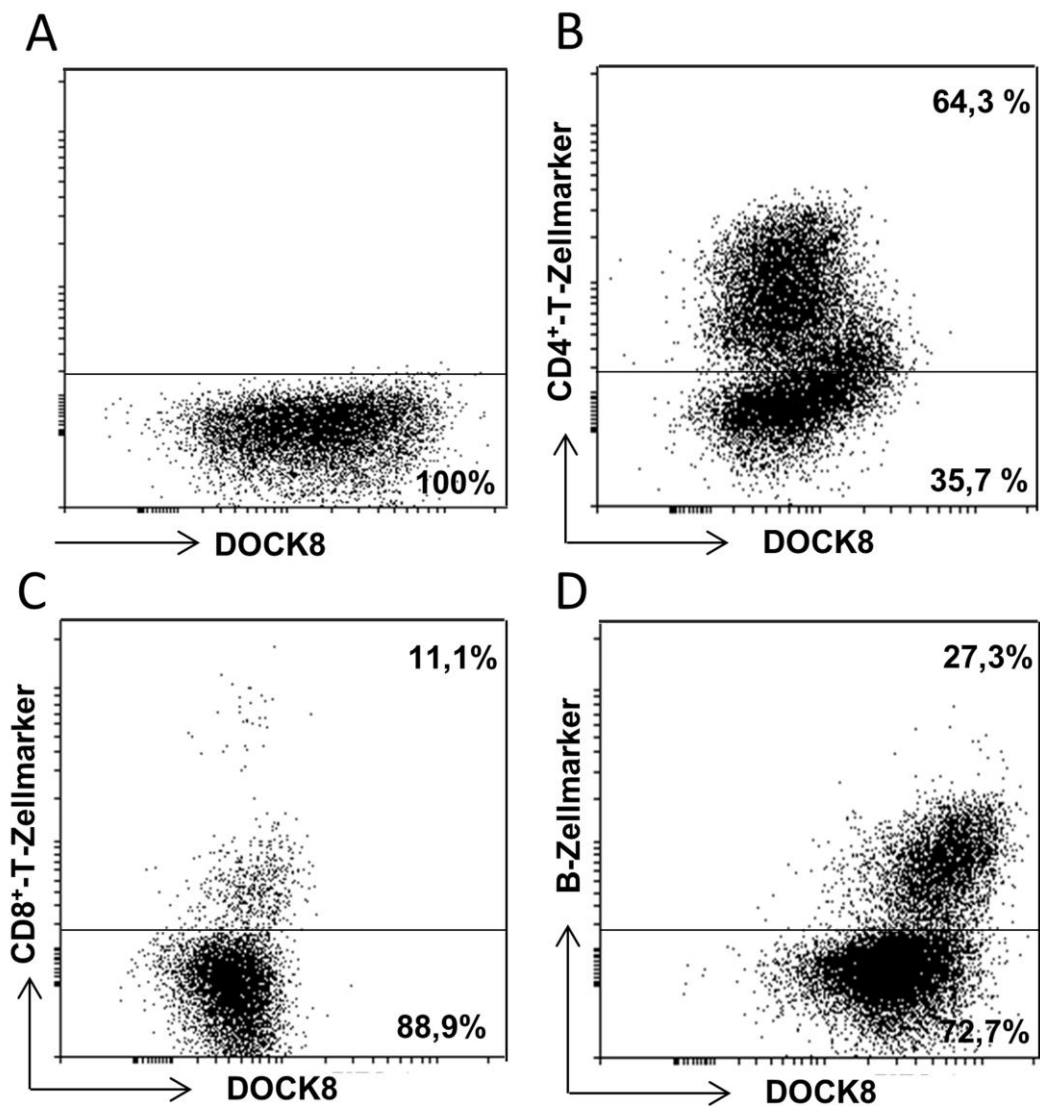


Abb. 4.7: Expression von DOCK8 in unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen

Die Expressionsstärke von DOCK8 in den PBL gesunder Pferde wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt und ist im Dotplot dargestellt. Dargestellt sind ausschließlich die Zellen innerhalb des Lymphozytengates. Im unteren Abschnitt sind einfach positive Zellen dargestellt, im oberen Abschnitt Zellen, die sowohl das jeweilige Markerantigen exprimieren, als auch DOCK8. Die Einfachfärbung (A) mit einem anti-DOCK8-Antikörper bestätigt die Expression des Proteins auf allen Lymphozyten innerhalb des Gates. Die Dotplots B-D zeigen die Verteilung der DOCK8-Expression in den CD4⁺-T-Zellen (B) und den CD8⁺-T-Zellen (C) sowie in B-Zellen (D).

Die Ermittlung der geo MFI der doppelt positiven Zellpopulation ergab, dass DOCK8 in T- und B-Zellen unterschiedlich stark exprimiert wird. Zwischen der Expressionsstärke von DOCK8 in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen bestand kein signifikanter Unterschied, jedoch konnte eine geringgradig stärkere Expression in den CD8⁺-T-Zellen verzeichnet werden. In den B-Zellen wurde das Protein signifikant stärker exprimiert als in den CD4⁺-T-Zellen (Abb. 4.8).

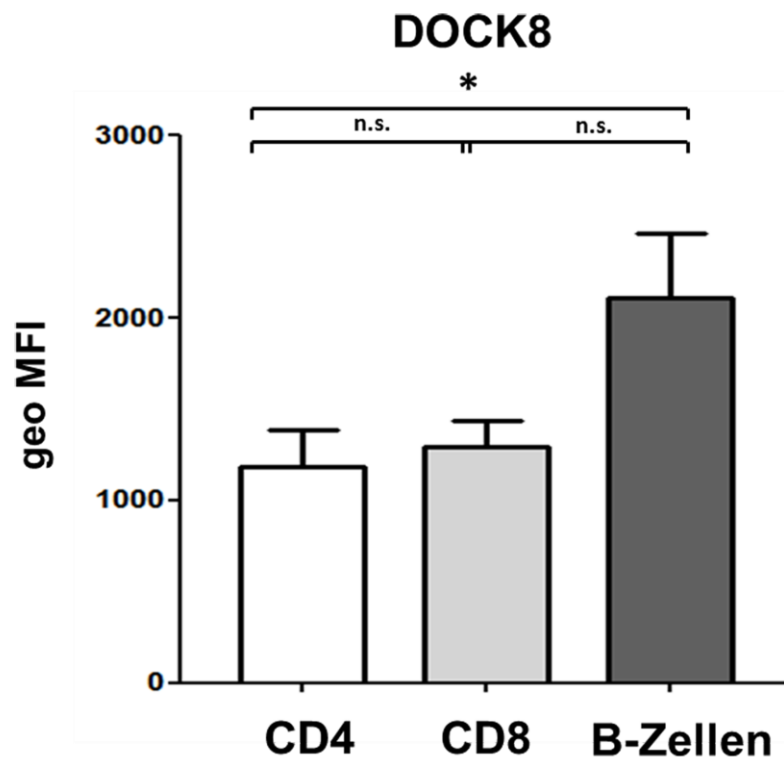


Abb. 4.8: Durchflusszytometrische Bestimmung der geo MFI der DOCK8 Expression in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen der Expressionsstärke von DOCK8 in CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen vor. Die Expressionsstärke in diesen Subpopulationen liegt deutlich niedriger als in B-Zellen. Eine signifikante, 1,8-fache (* $p \leq 0,05$) Erhöhung der geo MFI von DOCK8 ergibt sich bei den B-Zellen im Vergleich zu der geo MFI in den CD4⁺-T-Zellen. Im Vergleich zu den CD8⁺-T-Zellen ist die Expressionsstärke bei den B-Zellen um den Faktor 1,6 erhöht.

4.1.2.3 Differentielle Expression von DOCK8 in PBL von an ERU erkrankten Pferden

Im nächsten Schritt waren vor allem mögliche Unterschiede der DOCK8-Expression zwischen augengesunden und an ERU erkrankten Pferden von Interesse. Die verminderte oder ausbleibende DOCK8-Expression bei Menschen und Mäusen hat bedeutenden Einfluss auf die Funktionen von B- und T-Lymphozyten (Yamamura et al., 2017, Randall et al., 2011, Randall et al., 2009). Aus diesem Grund könnten Untersuchungen zu Expressionsunterschieden von DOCK8 in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde einen entscheidenden Beitrag für die Aufklärung der Pathogenese der ERU darstellen. Im Western Blot gelang der Nachweis von DOCK8 in PBL gesunder Pferde. Anhand der Bandenintensität konnte eine hohe Expressionsstärke des Proteins im PBL-Lysat nachgewiesen werden. Vergleichend dazu wurde die Expressionsstärke von DOCK8 in PBL an ERU erkrankter Pferde analysiert. Es ergab sich eine hochsignifikante (***) $p < 0,001$ Reduktion auf den Faktor 0,6 in den PBL der erkrankten Pferde (Abb. 4.9).

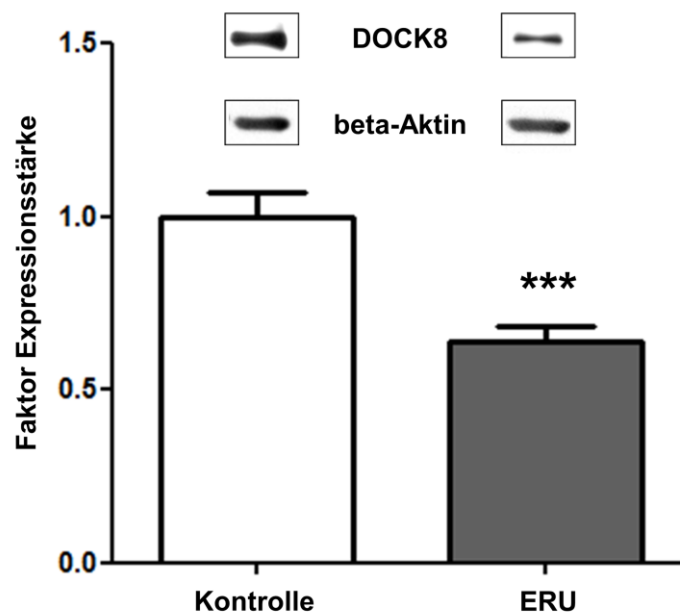


Abb. 4.9: Nachweis der differentiellen Expression von DOCK8 in Lymphozyten von gesunden (weiß) und an ERU erkrankten (grau) Tieren im Western Blot. Auf der y-Achse ist die Expressionsstärke von DOCK8 in den PBL der getesteten Tiere dargestellt. Die jeweiligen Banden im Western Blot wurden quantifiziert und die Werte auf beta-Aktin normalisiert. Als Bezugsgröße diente der Mittelwert der DOCK8 Expression (= Faktor 1) in den PBL der Kontrollgruppe (n=16). Die Expression in den PBL der erkrankten Gruppe (n=36) wurde dazu in Relation gesetzt. Die Expressionsstärke auf den Lymphozyten erkrankter Tiere war hochsignifikant (***) auf den Faktor 0,6 reduziert.

Um herauszufinden, von welcher Subpopulation der Lymphozyten diese Reduktion der DOCK8 Expression ausgeht, wurde in weiteren Experimenten die Expression von DOCK8 in den T- und B-Zellen augengesunder und erkrankter Tiere bestimmt. Hierfür wurden Lymphozytenproben beider Phänotypen mittels Durchflusszytometrie untersucht und die Expressionsstärke von DOCK8 verglichen. Während die Expressionsstärke in den CD8⁺-T-Zellen zwischen gesunden und erkrankten Tieren nahezu identisch war, zeigten sich bei den CD4⁺-T-Zellen und bei den B-Zellen Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen. Die Expressionsstärke von DOCK8 war in den CD4⁺-T-Zellen bei erkrankten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe auf 83 % reduziert (siehe Abb. 4.10). Signifikant niedriger exprimiert war das Protein in den B-Zellen erkrankter Pferde. Die Expressionsstärke von DOCK8 war hier auf 56 % reduziert.

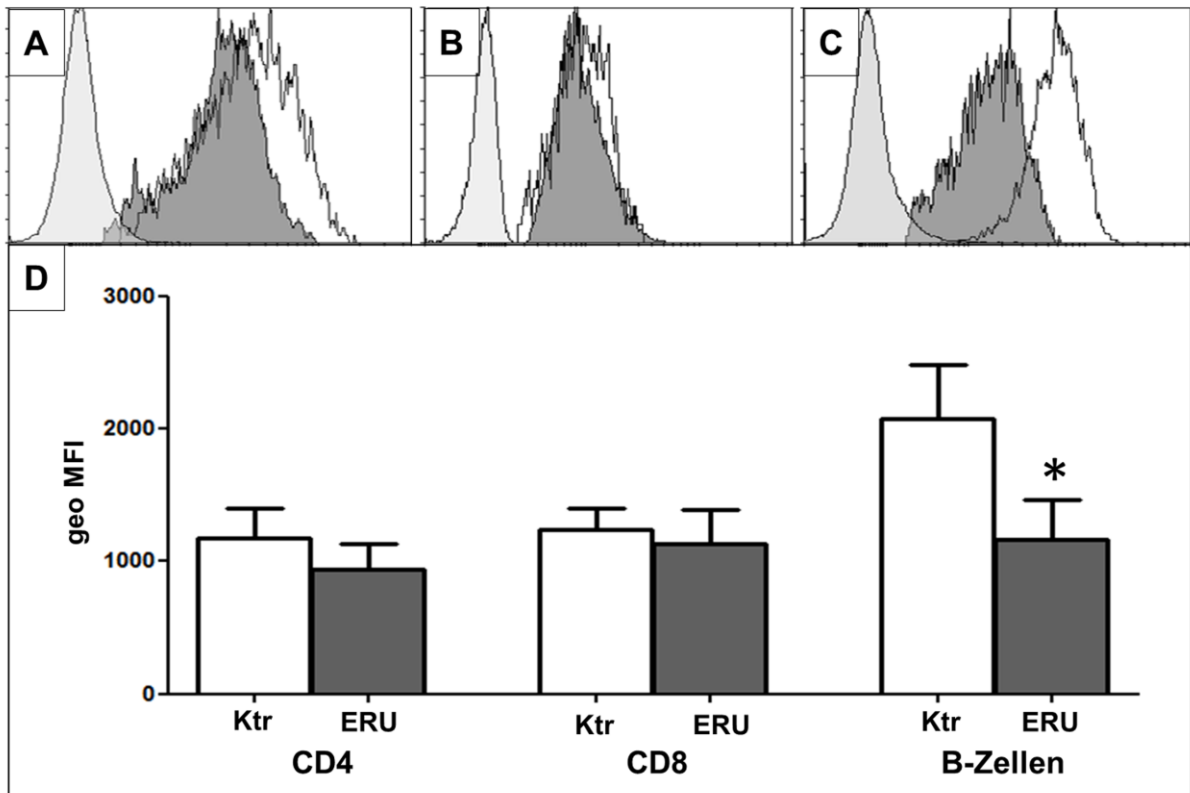


Abb. 4.10: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen der DOCK8-Expression in den Lymphozytensubpopulationen gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Die drei Histogramme zeigen vergleichend die Expressionsstärke von DOCK8 in CD4⁺-T-Zellen (A), CD8⁺-T-Zellen (B) und B-Zellen (C) von gesunden (weiß) und erkrankten (dunkelgrau) Pferden. Das hellgraue Histogramm zeigt repräsentativ die jeweilige Isotypkontrolle. D: Die geo MFI Werte der DOCK8-Expression von gesunden (n=13) und erkrankten (n=12) Pferden wurden unter Abzug der jeweiligen Isotypkontrolle ausgewertet und statistisch analysiert. Die Expressionsstärke bei den CD4⁺-T-Zellen erkrankter Pferde war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf 83 % reduziert. Bei den CD8⁺-T-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und kranken Pferden, die Expressionsstärke von DOCK8 war bei den erkrankten Tieren auf 95 % reduziert. Ein signifikanter Unterschied konnte bei den B-Zellen detektiert werden. Die geo MFI der DOCK8 Expression war bei den erkrankten Tieren auf 56 % reduziert (* p < 0,05).

4.1.1.4 Nachweis der unterschiedlichen Abundanz von DOCK8 in den B- und T-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde mittels Immunzytochemie

Mittels Immunzytochemie wurden PBL gesunder und erkrankter Pferde auf die Expression von DOCK8 analysiert. Auch hier bestätigte sich, dass das Protein bei allen Lymphozytensubpopulationen exprimiert wird. Das Expressionsmuster von DOCK8 war in Pferdezellen bisher unbekannt. Uns interessierte vor allem das Verteilungsmuster des Proteins in den T- und B-Lymphozyten. Das Verteilungsmuster des Proteins war in T- und B-Lymphozyten ähnlich (vgl. Abb. 4.11). Das intrazellulär lokalisierte Protein war vor allem randständig am Zellkern verteilt. In den B-Zellen konnte ein leichter Übergang zu einem diffusen Verteilungsmuster beobachtet werden. Hinsichtlich der Expressionsstärke gab es Unterschiede. In den B-Zellen wurde das Protein stärker exprimiert als in den T-Zellen. Von Interesse waren auch Unterschiede im Verteilungsmuster und der Expressionsstärke zwischen den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Das Verteilungsmuster von DOCK8 in den T-Zellen der erkrankten Pferde ähnelte dem in den T-Zellen der gesunden Pferde. Das Protein war größtenteils am Rand des Zellkerns angeordnet. Die Expressionsstärke war geringgradig erniedrigt. In den B-Zellen an ERU erkrankter Pferde konnte das Protein, wie auch in den B-Zellen gesunder Pferde, vor allem am Rand des Zellkerns detektiert werden. Eine Tendenz zu einer diffusen Ausbreitung zeigte sich auch hier. Ein Unterschied zu den B-Zellen der gesunden Pferde ergab sich in den B-Zellen der erkrankten Pferde hinsichtlich der Expressionsstärke von DOCK8. Das Protein wurde von den B-Lymphozyten der an ERU erkrankten Pferde deutlich geringer exprimiert als in den B-Lymphozyten gesunder Pferde.

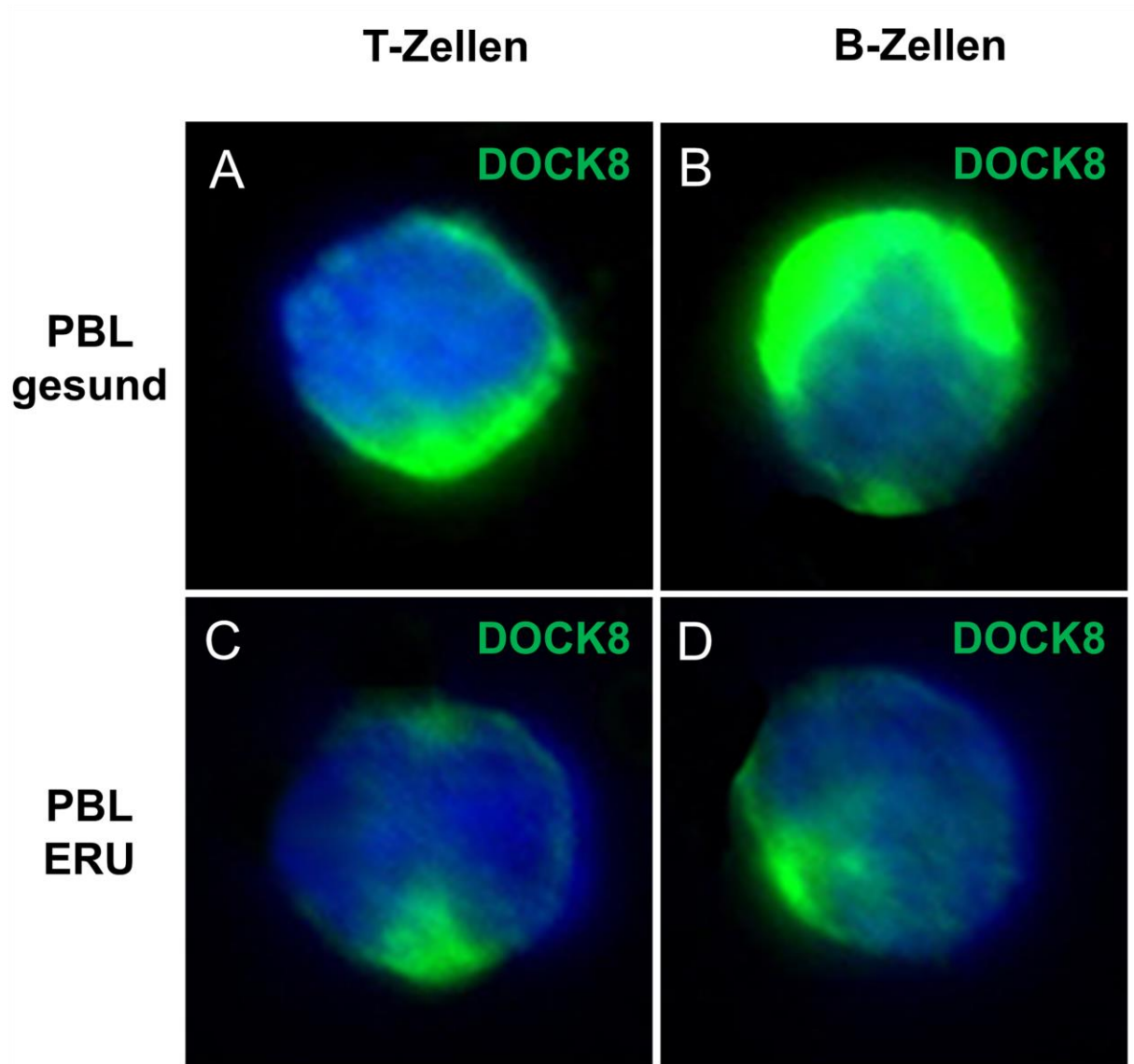


Abb. 4.11: Repräsentative immunzytochemische Darstellung der unterschiedlichen Regulation von DOCK8 in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Dargestellt sind jeweils T- und B-Zellen augengesunder Kontrolltiere (A, B) und erkrankter Tiere (C, D). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Expression von DOCK8 (grün) kann bei allen Lymphozyten dargestellt werden. Das Protein war in den T-Lymphozyten gesunder Pferde (A) intrazellulär hauptsächlich marginal um den Zellkern herum lokalisiert. In den B-Lymphozyten lag ein marginales bis diffuses Verteilungsmuster vor. DOCK8 wurde in den B-Lymphozyten deutlich stärker exprimiert, als in den T-Zellen (B). Unterschiede in den Verteilungsmustern des Proteins ergaben sich bei den T-Lymphozyten (C) und B-Lymphozyten (D) der an ERU erkrankten Pferde nicht. Die Expressionsstärke in den B-Zellen der an ERU erkrankten Pferde war im Vergleich zu der Expressionsstärke in B-Zellen gesunder Pferde deutlich vermindert.

4.2 Identifikation potentieller DOCK8-Interaktoren mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie

Da DOCK8 für die Pathogenese der ERU ein hochinteressantes Protein darstellt, waren für uns die Protein-Protein-Interaktionen des Moleküls von besonderem Interesse. Vor allem die Interaktion mit weiteren signalübertragenden Molekülen könnte neue Hinweise auf die Funktion von DOCK8 liefern. Mit dem Ziel, die Rolle von DOCK8 in der Zelle näher zu charakterisieren, wurden mittels Immunpräzipitation und massenspektrometrischer Analyse insgesamt 592 Proteine identifiziert. Anhand einer Vorauswahl, bei der die Proteine mit mindestens 2 Peptiden und einer Anreicherung von mindestens Faktor 2 berücksichtigt wurden, konnten 126 Interaktorproteine von DOCK8 selektiert werden (siehe Tab. 4.2). Als Positivkontrolle konnte DOCK8 selbst mit einer 21-fachen Anreicherung und einem Peptid Count von 43 nachgewiesen werden (siehe Tab. 4.2, Protein Nr. 6).

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Nummer ^C	Ratio ^D
1	FAM161A	ENSECAP00000022104	Infinity
2	Keratin, type I cytoskeletal 42	ENSECAP00000013434	Infinity
3	Complement component 1R	ENSECAP00000019132	39,8
4	Poly [ADP-ribose] polymerase	ENSECAP00000017400	36,6
5	Alpha-2-macroglobulin	ENSECAP00000010822	26,4
6	Dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8)	ENSECAP00000010583	21,2
7	Transferrin	ENSECAP00000016524	16,2
8	Prohibitin-2	ENSECAP00000015308	12,2
9	Alpha-centractin-like protein	ENSECAP00000022084	11,4
10	Complement C1s subcomponent	ENSECAP00000007898	10,0
11	Tyrosine-protein kinase JAK3	ENSECAP00000016316	9,9
12	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 1	ENSECAP00000021983	9,9
13	Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL1	ENSECAP00000017058	9,3
14	Actinin alpha 3	ENSECAP00000017987	8,4
15	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	ENSECAP00000013519	8,3
16	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 4	ENSECAP00000020868	8,0
17	Smoothelin	ENSECAP00000015471	7,9
18	Unconventional myosin-Ic	ENSECAP00000011103	6,9
19	Hematopoietic lineage cell-specific protein 1(HCLS1)	ENSECAP00000013412	6,8
20	Complement C1q subcomponent subunit C	ENSECAP00000017775	6,7
21	Stomatin 2, mitochondrial isoform X2	ENSECAP00000015477	6,6

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Nummer ^C	Ratio ^D
22	Hexokinase-1 isoform X3	ENSECAP00000009472	6,5
23	Beta-parvin	ENSECAP00000007297	6,4
24	Histone H4	ENSECAP00000001598	6,3
25	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ENSECAP00000009522	6,0
26	Complement C1q subcomponent subunit B	ENSECAP00000017316	5,8
27	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	ENSECAP00000018956	5,7
28	Unconventional myosin-Ig	ENSECAP00000016084	5,6
29	Unconventional myosin-XVIIIa isoform X10	ENSECAP00000018749	5,6
30	Actin, aortic smooth muscle	ENSECAP00000000126	5,5
31	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	ENSECAP00000007749	5,5
32	Microsomal glutathione S-transferase 3	ENSECAP00000019728	5,3
33	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ENSECAP00000013839	5,2
34	Ras suppressor protein 1	ENSECAP00000014923	5,1
35	Protein flightless-1 homolog	ENSECAP00000015165	5,1
36	Tubulin beta 4A chain	ENSECAP00000011439	5,1
37	Tubulin beta 5 chain	ENSECAP00000017687	5,0
38	MICOS complex subunit MIC60	ENSECAP00000022179	4,9
39	Gelsolin	ENSECAP00000017333	4,8
40	Phosphate carrier protein, mitochondrial isoform X2	ENSECAP00000012953	4,8
41	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ENSECAP00000010719	4,8
42	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	ENSECAP00000021701	4,8
43	Actin-related-protein 3	ENSECAP00000018525	4,6
44	40S ribosomal protein S24	ENSECAP00000014536	4,6
45	Myosin regulatory light polypeptide 9	ENSECAP00000005628	4,5
46	Vinculin	ENSECAP00000011640	4,5
47	Nexilin isoform X2	ENSECAP00000012939	4,5
48	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	ENSECAP00000020229	4,4
49	Rho GTPase-activating protein 26	ENSECAP00000010475	4,4
50	Actin cytoplasmatic 1	ENSECAP00000016124	4,3
51	Complement C1q subcomponent subunit A	ENSECAP00000018479	4,3
52	Histone H2A	ENSECAP00000001117	4,2
53	Tropomyosin alpha-3 chain	ENSECAP00000009031	4,1
54	Sideroflexin	ENSECAP00000017081	4,1
55	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	ENSECAP00000007174	4,0
56	Tubulin beta 1 chain	ENSECAP00000022663	3,9
57	Ankyrin repeat and zinc finger domain-containing protein 1	ENSECAP00000014155	3,8
58	Histone H2B	ENSECAP00000001470	3,7
59	Actin, cytoplasmic 1	ENSECAP00000013637	3,7
60	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ENSECAP00000018000	3,6
61	Enolase 1	ENSECAP00000004949	3,6
62	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	ENSECAP00000004957	3,6

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Nummer ^C	Ratio ^D
63	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	ENSECAP00000009685	3,5
64	60S Ribosomal Protein L10	ENSECAP00000014927	3,5
65	Myosin regulatory light polypeptide 9	ENSECAP00000007496	3,4
66	Tubulin alpha 4A chain	ENSECAP00000012261	3,4
67	60S ribosomal protein L23	ENSECAP00000011950	3,4
68	Integrin-linked-kinase (ILK)	ENSECAP00000005609	3,2
69	ATP synthase subunit d	ENSECAP00000007497	3,2
70	Nucleolar protein 56	ENSECAP00000018952	3,1
71	RAS guanyl-releasing protein 2	ENSECAP00000020811	3,1
72	Poly(rC)-binding protein 1	ENSECAP00000001771	3,1
73	Tropomodulin-3	ENSECAP00000018986	3,0
74	60S ribosomal protein L30	ENSECAP00000019208	3,0
75	60S Ribosomal Protein L4	ENSECAP00000020849	3,0
76	MICOS complex subunit	ENSECAP00000000578	3,0
77	Fibronectin	ENSECAP00000005228	2,9
78	Ribosomal protein L18	ENSECAP00000019435	2,9
79	Tropomyosin alpha-4 chain	ENSECAP00000019820	2,8
80	Integrin beta	ENSECAP00000016485	2,8
81	40S ribosomal protein S12	ENSECAP00000001730	2,8
82	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	ENSECAP00000012086	2,8
83	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	ENSECAP00000010133	2,8
84	Complement C3	ENSECAP00000005652	2,7
85	Plastin-2	ENSECAP00000020814	2,7
86	Myosin light polypeptide 6	ENSECAP00000016002	2,7
87	Tropomyosin alpha-1 chain	ENSECAP00000012696	2,7
88	40S ribosomal protein S17	ENSECAP00000004242	2,7
89	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	ENSECAP00000019786	2,6
90	40S ribosomal protein S7	ENSECAP00000017788	2,6
91	40S ribosomal protein S23	ENSECAP00000017944	2,6
92	40S ribosomal protein S3	ENSECAP00000011789	2,5
93	Histone H1.2	ENSECAP00000022533	2,5
94	40S ribosomal protein S27	ENSECAP00000010955	2,4
95	60S acidic ribosomal protein P0	ENSECAP00000013355	2,4
96	40S ribosomal protein S2	ENSECAP00000007241	2,4
97	Filamin-A	ENSECAP00000009429	2,4
98	40S ribosomal protein S19	ENSECAP00000007757	2,4
99	40S ribosomal protein S20	ENSECAP00000010187	2,3
100	Vimentin	ENSECAP00000004638	2,3
101	40S ribosomal protein S15a	ENSECAP00000016852	2,3
102	Heat shock protein beta-1	ENSECAP00000017959	2,3
103	Talin 1	ENSECAP00000015561	2,3
104	Isocitrate dehydrogenase	ENSECAP00000005551	2,3

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Nummer ^C	Ratio ^D
105	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	ENSECAP00000002798	2,3
106	Prohibitin-2	ENSECAP00000014670	2,3
107	Von Willebrand Faktor	ENSECAP00000009178	2,2
108	Heat shock cognate 71 kDa protein	ENSECAP00000011500	2,2
109	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	ENSECAP00000011711	2,2
110	Septin 2	ENSECAP00000015383	2,2
111	Ribosomal protein L7A	ENSECAP00000006675	2,1
112	Pleckstrin	ENSECAP00000016719	2,1
113	40S ribosomal protein S16	ENSECAP00000003502	2,1
114	RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1	ENSECAP00000017751	2,1
115	Multimerin-1	ENSECAP00000009646	2,1
116	60S ribosomal protein L14	ENSECAP00000022995	2,1
117	60S Ribosomal Protein L26	ENSECAP00000000788	2,1
118	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ENSECAP00000007141	2,0
119	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	ENSECAP00000013147	2,0
120	SUN domain-containing protein 2	ENSECAP00000001880	2,0
121	Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)	ENSECAP00000007853	2,0
122	FH1/FH2 domain-containing protein 1	ENSECAP00000011496	2,0
123	40S ribosomal protein S3a	ENSECAP00000007656	2,0
124	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	ENSECAP00000018381	2,0
125	Ribosomal protein L7	ENSECAP00000003176	2,0
126	60S ribosomal protein L9	ENSECAP00000014172	2,0

Tab. 4.2: Auswahl der Interaktorproteine von DOCK8. Mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie konnten Interaktionspartner von DOCK8 aus PBL gesunder Pferde (n=3) identifiziert werden. Berücksichtigt wurden jene Proteine, die mindestens mit 2 Peptiden identifiziert werden konnten und die im Verhältnis zu den Präzipitaten der Isotypkontrollen mindestens 2-fach stärker angereichert waren (126 Proteine). A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>); D: Verhältnis der Abundanzen im Immunpräzipitat des anti-DOCK8-Antikörpers zu denen im Präzipitat der Isotypkontrolle rabbit IgG (Ratio).

Mit der Identifikation der Interaktorproteine von DOCK8 war es möglich, zahlreiche noch nicht beschriebene Protein-Protein-Interaktionen des Moleküls zu detektieren. Diese Interaktionen zeigten neue Erkenntnisse über die Funktion von DOCK8 in Pferdezellen und könnten damit auch allgemeine weitere Hinweise über die Rolle des Proteins in der Zelle liefern. Unter der Vielzahl der identifizierten Proteine war

auch das Interaktorprotein Talin 1 (siehe Tab. 4.2, Protein Nr. 103) (Degroote et al., 2012, Degroote et al., 2013), das von uns bereits im Zusammenhang mit der Immunreaktion bei ERU beschrieben wurden. Auch HCLS1 (siehe Tab. 4.2, Protein Nr. 19) konnte als Interaktor von DOCK8 identifiziert werden.

4.3. Massenspektrometrische Identifikation von interagierenden Signaltransduktionsmolekülen bei gesunden und an ERU erkrankten Pferden

Die differentiellen Expressionsanalysen von Septin 7 (Degroote et al., 2014) und DOCK8 (siehe Kap. 4.1.2) in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Tiere, ergaben einen interessanten Ansatz für weitere Analysen. Da Protein-Protein-Interaktionen essentiell sind für zelluläre Funktionen, wie Zellmigration, Zellteilung und Immunreaktionen, ist das Interaktom für die Charakterisierung der Rolle bestimmter Proteine im Verlauf dieser Prozesse von großem Interesse. Aus diesem Grund wurden Protein-Protein-Interaktionen der oben genannten Proteine in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde mittels Immunpräzipitation und nachfolgender Massenspektrometrie identifiziert. Von besonderem Interesse waren für uns dabei die Interaktionsnetzwerke der beiden Proteine mit Signaltransduktionsmolekülen. Diese signalübertragenden Proteine sind für zelluläre Funktionen essentiell, da sie die Weiterleitung von äußeren oder inneren Signalen initiieren, die von Rezeptoren in der Zellmembran und innerhalb der Zelle aufgenommen werden. Über bestimmte Transkriptionsfaktoren werden verschiedene biologische Pfade und damit unterschiedliche zelluläre Funktionen aktiviert. Welche Signaltransduktionsmoleküle von Septin 7 und DOCK8 mittels IP präzipitiert werden, geben folglich einen Aufschluss über ihr jeweiliges Funktionsspektrum und die genaue Immunantwort im Rahmen der Pathogenese der von uns untersuchten Autoimmunerkrankung.

4.3.1 Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 und Signaltransduktionsmolekülen bei gesunden und an ERU erkrankten Pferden

Das Ziel weiterer Untersuchungen war es, interagierende Moleküle von Septin 7 zu identifizieren, die für eine differentielle Signalübertragung in Pferdezellen gesunder und an ERU erkrankter Tiere verantwortlich sind. Die Identifikation solcher mit Septin 7 interagierenden Signaltransduktionsmoleküle in peripheren Blutleukozyten beider Phänotypen könnte einen weiteren Aufschluss über die zellulären Prozesse liefern, die bei gesunden und erkrankten Pferden unterschiedlich ablaufen. Zu diesem Zweck wurden mittels einer weiteren Immunpräzipitation die mit Septin 7 ko-exprimierten Proteine in den PBL gesunder und erkrankter Pferde massenspektrometrisch analysiert. Insgesamt 707 Interaktionspartner von Septin 7 konnten bei diesem Experiment identifiziert werden. Die identifizierten Proteine wurden anhand ihrer biologischen Funktionen in Gruppen eingeteilt (siehe Abb. 4.12, oberes Tortendiagramm). Dabei wurde der Fokus auf die Interaktoren gelegt, die biologische Prozesse in der Zelle beeinflussen (siehe Abb. 4.12., unteres Tortendiagramm).

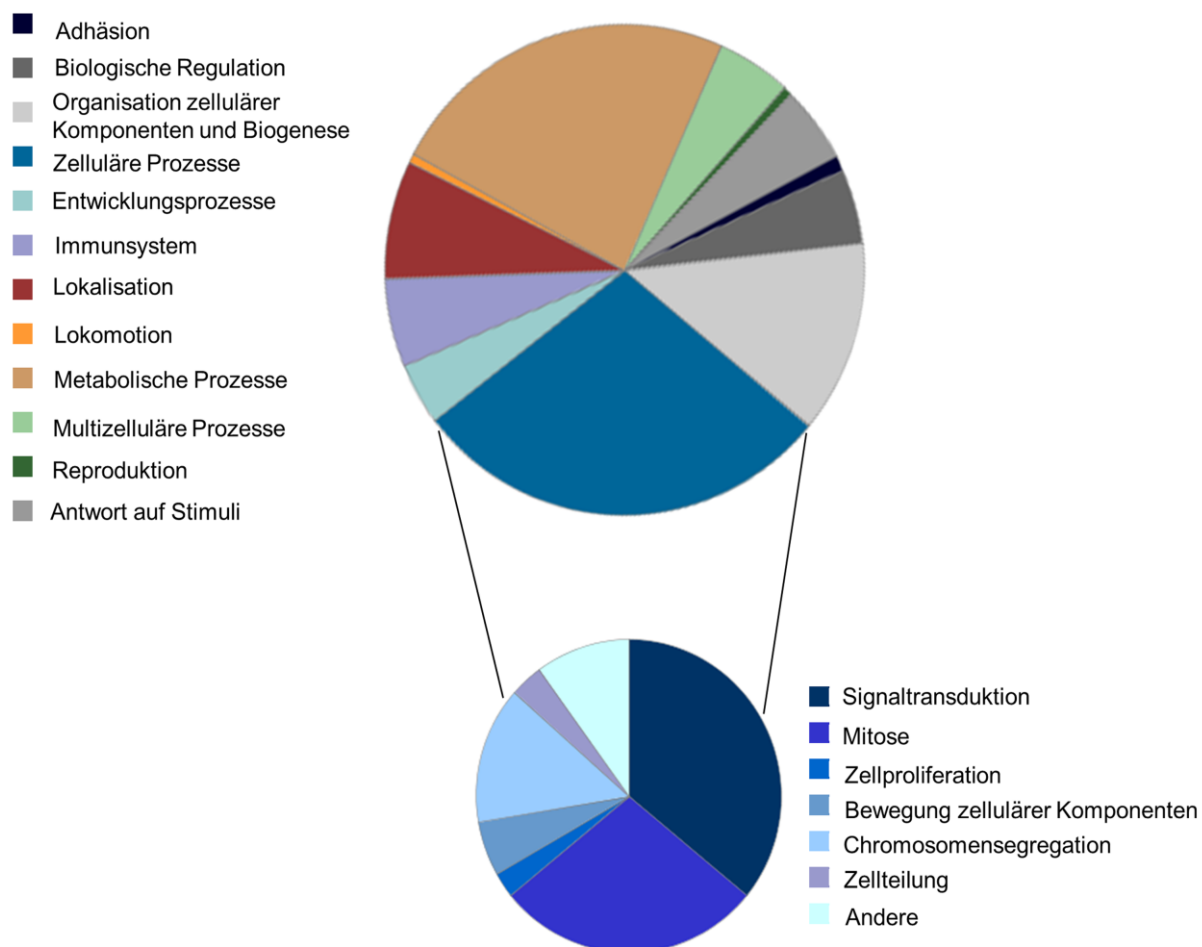


Abb. 4.12: Zuordnung massenspektrometrisch identifizierter Interaktionspartner von Septin 7 (vgl. Tab 4.2) zu biologischen Funktionen (dargestellt im oberen Tortendiagramm). Entsprechend ihrer zahlreichen Funktionen sind einige Proteine in mehreren Gruppen vertreten. Es erfolgte eine Subgruppierung der Proteine, denen eine Funktion bei zellulären Prozessen zukommt (unteres Tortendiagramm). Insgesamt 80 Proteine fielen in den Funktionsbereich Signaltransduktion.

Dazu gehörten Proteine, die mitotische Vorgänge regulieren (28,1 %) und die für Zellteilung (10 %) zuständig sind. Einen weiteren Anteil übernahmen Proteine, die für die Bewegung zellulärer Komponenten (9,2 %), die Zellerkennung (5,6 %) oder die Chromosomensegregation (3,5 %) verantwortlich sind. Dem größten Anteil gehörten aber Proteine an, die eine Funktion in der Signaltransduktion erfüllen (35,9 %). Von den 707 insgesamt identifizierten Proteinen, konnten 80 Proteine dieser Funktion zugeordnet werden. Anhand von stringenten Auswahlverfahren wurde eine Selektion dieser Interaktionspartner vorgenommen. Berücksichtigt wurden ausschließlich die Interaktionspartner, die in den Immunpräzipitaten der Kontrolltiere (siehe Tab. 4.3) beziehungsweise der an ERU erkrankten Pferde (siehe Tab. 4.4) mindestens mit einer 2-fachen Anreicherung und 2 Peptiden nachgewiesen wurden. Die drei identifizierten Signaltransduktionsmoleküle in PBL der Kontrolltiere (vgl. Tab. 4.3) waren neue, noch nie in Pferdelymphozyten beschriebene Interaktorproteine von Septin 7. Unter diesen Interaktionsproteinen waren zwei aufgrund ihrer in anderen Modellen beschriebenen Funktionen im Immunsystem (Stumhofer et al., 2006, Liu et al., 2005) von besonderem Interesse. Eines davon, Signal transducer and activator of transcription 1 ((STAT1) siehe Tabelle 4.3, Protein Nr. 3, Ratio: 4), ist ein zytokinregulierter Transkriptionsfaktor, dem bei der Maus bedeutende Funktionen bei der Differenzierung von Th1-Effektorzellen und bei der Hemmung der Th17-Immunantwort zugeordnet werden (Stumhofer et al., 2006). Da sowohl die Beteiligung einer Th1-Immunantwort (Gilger et al., 1999) als auch die Ausbildung einer Th17-Immunantwort bei der ERU diskutiert wird (Regan et al., 2012), ist die Identifikation von STAT1 als Interaktor von DOCK8 in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Neben STAT1 konnte auch das Struktur- und Signalpeptid ILK (siehe Tab. 4.3, Protein Nr. 1, Ratio: 7) als Interaktor von Septin 7 identifiziert werden. Das Protein übernimmt eine bedeutende Aufgabe bei der Signalübermittlung von der extrazellulären Matrix in den Zellkern (Hannigan et al., 1996). ILK greift außerdem in wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation (Teo et al., 2014), Apoptose, Zellteilung (Morris et al., 2015) und Migration (Liu et al., 2005) ein.

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Number ^C	Ratio ^D
1	Integrin-linked-kinase (ILK)	ENSECAP00000005609	7
2	Serine/threonine-protein kinase 24	ENSECAP00000005691	5
3	Signal transducer of transcription 1 (STAT1)	ENSECAP00000007853	4

Tab. 4.3: Mit Septin 7 interagierende Signaltransduktionsmoleküle in PBL gesunder Pferde.

Anhand von stringenten Auswahlkriterien konnten, von insgesamt 707 identifizierten Interaktionspartnern von Septin 7, drei Signaltransduktionsmoleküle selektiert werden. A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>); D: Verhältnis der Abundanzen im Immunpräzipitat des anti-Septin 7-Antikörpers zu denen im Präzipitat der Isotypkontrolle anti-Ratte IgG 2c (Ratio).

Da Signaltransduktionsmoleküle für die intra- und interzelluläre Signalübertragung verantwortlich sind, kann die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen solcher Proteine in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde einen Hinweis liefern, welche Prozesse bei erkrankten Pferden anders ablaufen. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Interaktion solcher Moleküle mit Septin 7 nun auch in den PBL an ERU erkrankter Pferde untersucht (vgl. Tab. 4.4). Auch in den PBL von an ERU erkrankten Pferden konnten Protein-Protein-Interaktionen zwischen Septin 7 und den drei bereits bei den Kontrollpferden identifizierten Interaktionspartnern festgestellt werden (siehe Tab. 4.3). Außerdem wurden zwei weitere Signaltransduktionsmoleküle detektiert, die in anderen Modellen mit interessanten Funktionen assoziiert sind (siehe Tab. 4.4). Zum einen das im Menschen bereits beschriebene Septin 7-Interaktionsprotein CDc42 (siehe Tab. 4.4, Protein Nr. 5, Ratio 2) und zum anderen das Ras Guanyl releasing protein 2 (siehe Tab. 4.4, Protein Nr. 4, Ratio 2).

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Number ^C	Ratio ^D
1	Integrin-linked-kinase (ILK)	ENSECAP00000005609	11
2	Signal transducer of transcription 1 (STAT1)	ENSECAP00000007853	10
3	Serine/threonine-protein kinase 24	ENSECAP00000005691	7
4	Ras Guanyl releasing protein 2	ENSECAP00000020811	2
5	Cell division control protein 42 CDc42	ENSECAP00000003324	2

Tab. 4.4: Mit Septin 7 interagierende Signaltransduktionsmoleküle in PBL an ERU erkrankter Pferde. Anhand von stringenten Auswahlkriterien konnten, von insgesamt 707 identifizierten Interaktionspartnern von Septin 7, fünf Signaltransduktionsmoleküle selektiert werden. A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>); D: Verhältnis der Abundanzen im Immunpräzipitat des anti-Septin 7-Antikörpers zu denen im Präzipitat der Isotypkontrolle anti-Ratte IgG 2c (Ratio).

4.3.2 Protein-Protein-Interaktionen von DOCK8 mit Signaltransduktionsmolekülen bei gesunden und an ERU erkrankten Pferden

Die im Kapitel 4.3.1 beschriebenen Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 erbrachten neue Hinweise über die Funktion des Proteins in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Im nächsten Schritt sollten auch die Protein-Protein-Interaktionen von DOCK8 mit Signaltransduktionsmolekülen in PBL gesunder und erkrankter Pferde untersucht werden. Mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie wurden Interaktionspartner von DOCK8 identifiziert und anhand ihrer biologischen Funktionen verschiedenen Gruppen zugeordnet (siehe Abb. 4.13, oberes Tortendiagramm). Ein Großteil der Proteine (28,6 %) gehörte Molekülen an, die für zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Mitose und Signaltransduktion verantwortlich sind. Den nächstkleineren Anteil (23,2 %) wiesen Proteine auf, die an metabolischen Prozessen beteiligt sind. Außerdem umfassten weitere Gruppen die Proteine, die an der Organisation oder Biogenese zellulärer Komponenten (14,2 %), Lokalisation (6,8 %) oder der Zelldifferenzierung (4,5 %) beteiligt sind. Einer weiteren Gruppe von Proteinen werden Funktionen im Immunsystem zugeordnet (5,6 %).

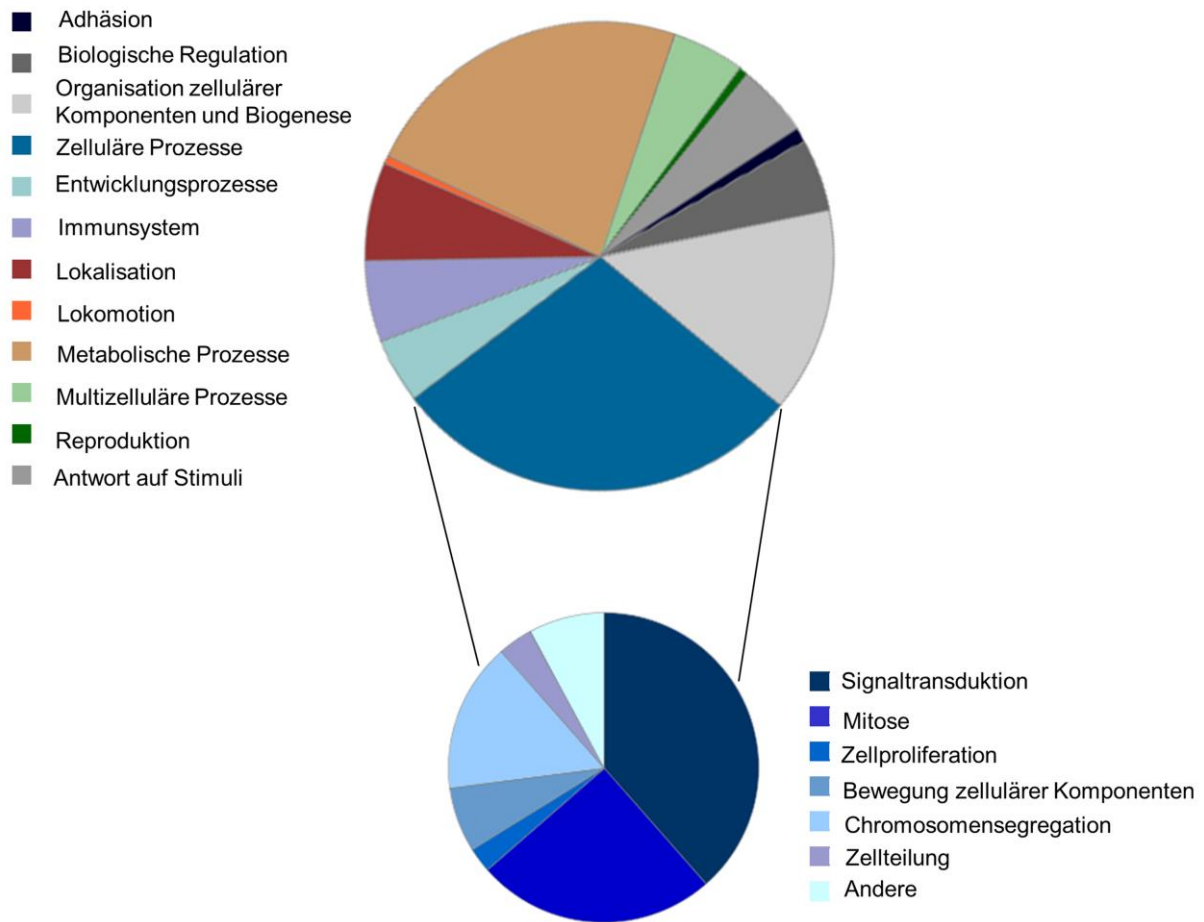


Abb. 4.13: Zuordnung massenspektrometrisch identifizierter Interaktionspartner von DOCK8 (vgl. Tab 4.2) zu biologischen Funktionen (dargestellt im oberen Tortendiagramm). Entsprechend ihrer zahlreichen Funktionen sind einige Proteine in mehreren Gruppen vertreten. Es erfolgte eine Subgruppierung der Proteine, denen eine Funktion bei zellulären Prozessen zukommt (unteres Tortendiagramm).

Wie auch im Kapitel 4.3.1 beschrieben, erfolgte eine Subgruppierung der Proteine, die für zelluläre Prozesse zuständig sind (siehe Abb. 4.13, unteres Tortendiagramm). Neben Proteinen mit Funktionen bei der Zellkommunikation und mitotischen Prozessen (32,2 %) wurden Proteine identifiziert, die für die Zellteilung (12,9 %), Zellkomponentenbewegung (11,6 %), Chromosomensegregation (6,5 %) oder die Zellproliferation (1,6 %) verantwortlich sind. Besonders relevant waren für uns jedoch die Proteine, denen eine Funktion bei der Signaltransduktion (25,8 %) zugeordnet wird. Nach den im Kapitel 4.3.1 beschriebenen Auswahlkriterien wurden auch mit

DOCK8 interagierende Signaltransduktionsmoleküle selektiert. Unter insgesamt 592 identifizierten Interaktionspartnern von DOCK8 in PBL gesunder Pferde befanden sich fünf Signaltransduktoren. Auch unter den mit DOCK8 ko-präzipitierten Signaltransduktionsmolekülen waren Proteine, die in anderen Spezies mit interessanten Immunfunktionen assoziiert werden. Darunter befand sich die Tyrosin-Protein-Kinase JAK3 (vgl. Tab. 4.5, Protein Nr. 1, Ratio 5), die als Interaktionspartner von DOCK8 identifiziert wurde. Dieser Zytokin-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase werden im Mausmodell bedeutende Funktionen in der intrazellulären Signalübertragung von T-Zellen (aus Milz und Lymphknoten) zugeordnet (Botbol et al., 2015). Indem sie den JAK-STAT-Signalweg aktivieren und STAT-Proteine phosphorylieren, spielen sie eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen, unter anderem bei der T-Zellproliferation und Differenzierung (Smith et al., 2016). Als weiterer Interaktionspartner von DOCK8 konnte ILK identifiziert werden (siehe Tab. 4.5, Protein Nr. 3, Ratio: 2). Aufgrund der zahlreichen interessanten Funktionen dieses Proteins (vgl. Kap. 4.3.1) könnte diese Protein-Protein-Interaktion bedeutende Informationen über die Funktion von DOCK8 liefern.

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Nummer ^C	Ratio ^D
1	Tyrosin-protein kinase JAK3	ENSECAP00000016316	5
2	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	ENSECAP00000004957	2
3	Integrin-linked kinase (ILK)	ENSECAP00000005609	2
4	Pleckstrin	ENSECAP00000016719	2
5	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	ENSECAP00000021701	2

Tab. 4.5: Mit DOCK8 interagierende Signaltransduktionsmoleküle in PBL gesunder Pferde.

Anhand von stringenten Auswahlkriterien konnten von insgesamt 595 identifizierten Interaktionspartnern von DOCK8 5 Signaltransduktionsmoleküle im Immunpräzipitat der gesunden Pferde selektiert werden. A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>); D: Verhältnis der Abundanzen im Immunpräzipitat des anti-DOCK8 Antikörpers zu denen im Präzipitat der Isotypkontrolle rat IgG 2c (Ratio).

Um weitere Hinweise zu Pathogenese-assoziierten Funktionen von DOCK8 bei an ERU erkrankten Pferden zu gewinnen, wurden die Protein-Protein-Interaktionen von DOCK8 mit Signaltransduktionsmolekülen auch in PBL an ERU erkrankter Pferde analysiert. Auf diese Weise konnten 10 interagierende Signaltransduktionsmoleküle mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden. Unter diesen Proteinen waren Tyrosin-Protein-Kinase JAK3 (vgl. Tab. 4.6, Protein Nr.4, Ratio: 3) und ILK (vgl. Tab. 4.6, Protein Nr. 8, Ratio: 2), die bereits als DOCK8-Interaktionspartner in PBL gesunder Pferde detektiert wurden (siehe Tab. 4.5). Neben den Proteinen, die bereits in den PBL gesunder Pferde als Interaktionspartner von DOCK8 detektiert wurden, konnten weitere hochinteressante Signaltransduktionsmoleküle identifiziert werden. Darunter war zum einen CDc42 als interagierendes Signaltransduktionsmolekül von DOCK8 (vgl. Tab. 4.6, Protein Nr. 13, Ratio: 2). Die in der Maus bereits bekannte Protein-Protein-Interaktion zwischen CDc42 und DOCK8 wurde in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte, die die Auswirkungen der DOCK8 abhängigen CDc42-Aktivierung auf das Immunsystem untersuchten (Xu et al., 2017, Shiraishi et al., 2016). Die massenspektrometrische Analyse ergab eine 2-fache Anreicherung in den PBL an ERU erkrankter Pferde, während das Protein in den PBL gesunder Pferde nicht angereichert wurde. Die unterschiedliche Anreicherung in den Präzipitaten gesunder und an ERU erkrankter Pferde könnte Hinweise auf abweichende Signalvorgänge in den Zellen liefern. Besonders interessant war für uns die Identifikation von STAT1 (siehe Tab. 4.6, Protein Nr. 10, Ratio 2) in den Immunpräzipitaten der an ERU erkrankten Pferde.

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession Number ^C	Ratio ^D
1	Guanine nucleotide-binding protein G(I) subunit alpha-2	ENSECAP00000000530	5
2	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	ENSECAP00000004957	3
3	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	ENSECAP00000021701	3
4	Tyrosin-protein kinase JAK3	ENSECAP00000016316	3
5	Ras-related protein RAP-1B	ENSECAP00000003835	3
6	Integrin-linked kinase (ILK)	ENSECAP00000005609	2
7	Pleckstrin	ENSECAP00000016719	2
8	Signal transducer of transcription 1 (STAT1)	ENSECAP00000007853	2
9	Cell division control protein 42	ENSECAP00000003324	2
10	Ras GTPase-activating protein 3	ENSECAP00000013060	2

Tab. 4.6: Mit DOCK8 interagierende Signaltransduktionsmoleküle in PBL an ERU erkrankter Pferde. Anhand von stringenten Auswahlkriterien konnten von insgesamt 595 identifizierten Interaktionspartnern von DOCK8 10 Signaltransduktionsmoleküle selektiert werden. A: Fortlaufende Nummer; B: Name des identifizierten Proteins; C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>); D: Verhältnis der Abundanzen im Immunpräzipitat des anti DOCK8 Antikörpers zu denen im Präzipitat der Isotypkontrolle rat IgG 2c (Ratio).

Der Transkriptionsfaktor STAT1 wurde bereits als Interaktorprotein von Septin 7 identifiziert (siehe Kap. 4.3.1). Eine differentielle Expression des Proteins führt bei der Maus zu bedeutenden Veränderungen der Immunantwort (Fang et al., 2015). Die umfassenden Immunfunktionen von STAT1 war Anlass, die Expression des Proteins in Pferdelymphozyten näher zu charakterisieren. Neben STAT1 wurde ein weiteres Signaltransduktionsmolekül zu Untersuchungen in Pferdezellen ausgewählt. ILK wurde, wie auch STAT1 bereits als Interaktorprotein von Septin 7 identifiziert (siehe Kap. 4.3.1). Die in anderen Modellen beschriebenen Funktionen von ILK waren für uns von besonderem Interesse. Vor allem der Einfluss des Proteins auf die zelluläre Signalübermittlung bei Entzündungsprozessen (Ahmed et al., 2014) und die T-Zell-medierten Funktionen, wie T-Zell Ausbreitung, Migration und Zytotoxizität (Boutet et al., 2016) war für eine nähere Charakterisierung des Proteins in Pferdezellen ausschlaggebend. Somit war die Interaktion der Signaltransduktionsmoleküle STAT1 und ILK mit Septin 7 und DOCK8 der Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

4.4. Verifikation der Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 und DOCK8

Die mittels Immunpräzipitation detektierten und massenspektrometrisch identifizierten Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 und DOCK8 mit den Signaltransduktionsmolekülen ILK und STAT1 sollten im nächsten Schritt verifiziert werden. Sowohl ILK als auch STAT1 werden bedeutende Funktionen im Immunsystem zugeordnet. Eine nähere Charakterisierung der Proteine könnte daher zum einen Pathogenese-assoziierte Mechanismen im Rahmen der ERU aufklären und zum anderen über generelle Funktionen von Septin 7 und DOCK8 Aufschluss geben. ILK und STAT1 wurden bisher nicht in Pferdelymphozyten beschrieben (PubMed-Recherche, Januar 2017). Das Ziel war es deshalb, die beiden Proteine nicht nur in den Immunpräzipitaten von Septin 7 und DOCK8 nachzuweisen, sondern auch umgekehrt Immunpräzipitate von STAT1 und ILK auf das Vorhandensein von Septin 7 und DOCK8 zu untersuchen.

4.4.1 Verifizierte Interaktion zwischen Septin 7 und den Signaltransduktionsmolekülen STAT1 und ILK

Zur Verifikation der Interaktion zwischen Septin 7 und STAT1 oder ILK diente eine Immunpräzipitation. Der anschließende Rückwärts-IP Blot konnte eine solche Interaktion bestätigen. Sowohl STAT1 als auch ILK konnten im Septin 7 Präzipitat nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.14 A). Auch in den Präzipitaten von STAT1 und ILK konnte im Western Blot das Protein Septin 7 detektiert werden (vgl. Abb. 4.14 B und C).

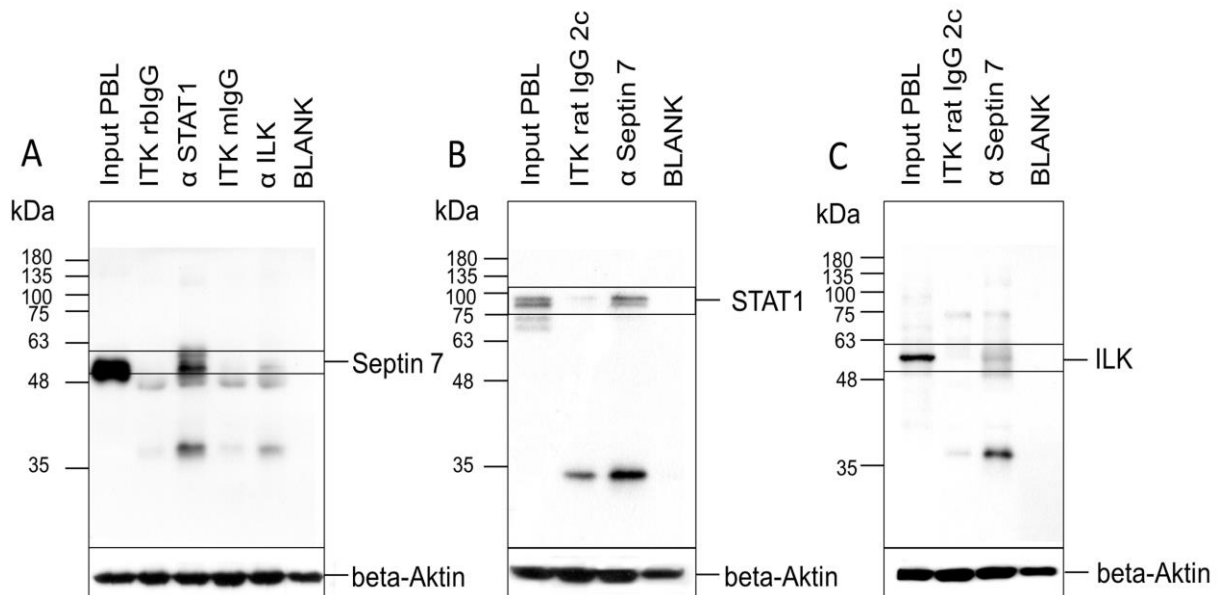


Abb. 4.14: Verifikation der Interaktion zwischen Septin 7 und den Signaltransduktionsmolekülen STAT1 und ILK im Rückwärts-IP Western Blot. Untersucht wurde die Interaktion mittels einer mit Kontroll-PBL durchgeführten Immunpräzipitation. Die Immunpräzipitate des anti-Septin 7-Antikörpers, des anti-STAT1-Antikörpers und des anti-ILK Antikörpers wurden auf die Interaktion mit den jeweiligen anderen Proteinen untersucht. Septin 7 konnte in den Präzipitaten des anti-STAT1- und des anti-ILK-Antikörpers nachgewiesen werden (A). Ebenso gelang der Nachweis von STAT1 (B) und ILK (C) im Septin 7 Immunpräzipitat. Die Spezifität der Antikörperbindung wurde durch entsprechende Isotypkontrollen überprüft (ITK rabbit IgG (rblgG) für STAT1; ITK rat IgG 2c für Septin 7; ITK mouse IgG (mlgG) für ILK). Die Ladungskontrolle erfolgte mit beta-Aktin.

4.4.2 Verifizierte Interaktion zwischen DOCK8 und den Signaltransduktionsmolekülen STAT1 und ILK

Um die Interaktion von DOCK8 mit STAT1 und ILK bestätigen zu können, wurde erneut eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die mit einem anti-DOCK8-Antikörper aus dem Lysat von Kontroll-PBL ko-präzipitierten Proteine ILK und STAT1 konnten im Western Blot detektiert werden (vgl. Abb. 4.15).

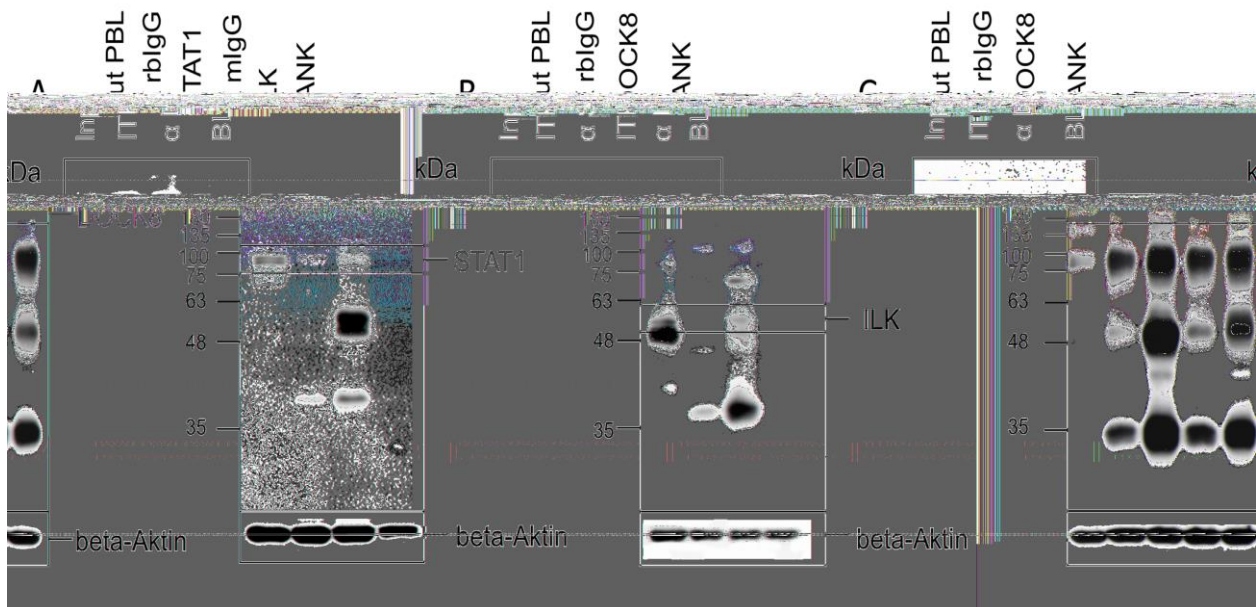


Abb. 4.15: Verifikation der Interaktion zwischen DOCK8 und den Signaltransduktionsmolekülen STAT1 und ILK mit Rückwärts-IP im Western Blot. Die Immunpräzipitate des anti-DOCK8-Antikörpers, des anti-STAT1-Antikörpers und des anti-ILK-Antikörpers wurden auf die Interaktion mit den jeweiligen anderen Proteinen untersucht. DOCK8 konnte schwach in den Präzipitaten des anti-STAT1 und des anti-ILK-Antikörpers nachgewiesen werden (A). Ebenso gelang der Nachweis von STAT1 (B) und ILK (C) im DOCK8 Immunpräzipitat. Die Spezifität der Antikörperbindung wurde durch entsprechende Isotypkontrollen überprüft (ITK rabbit IgG (rbIgG) für STAT1 und DOCK8; ITK Maus IgG 3 (mlgG) für ILK). Die Ladungskontrolle erfolgte mit beta-Aktin.

4.5 Untersuchungen zu den Interaktionspartnern STAT1 und ILK

Da sowohl STAT1 als auch ILK als Interaktionspartner von DOCK8 und Septin 7 für die Pathophysiologie der ERU von Bedeutung sein können, war es Ziel der weiteren Untersuchungen, die Proteine in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde näher zu charakterisieren.

4.5.1 Phänotypisierung von STAT1 in Pferdelymphozyten

STAT1 wurde als interagierendes Signaltransduktionsmolekül von Septin 7 und DOCK8 in Pferdeleukozyten identifiziert (vgl. Kap 4.2, Kap. 4.3). Das Protein wurde bisher nicht in Pferdezellen beschrieben. Daher diente zunächst eine durchflusszytometrische Analyse zur Phänotypisierung des Signaltransduktionsmoleküls in den PBL gesunder Pferde. In allen getesteten Zellen konnte STAT1 detektiert werden (vgl. Abb. 4.16). Interessant war für uns, in welchen Lymphozytensubpopulationen das Protein exprimiert wird. Daher diente eine Doppelfärbung mit den entsprechenden Zellmarkern zur Phänotypisierung von STAT1 in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen. In allen Subpopulationen wurde STAT1 exprimiert.

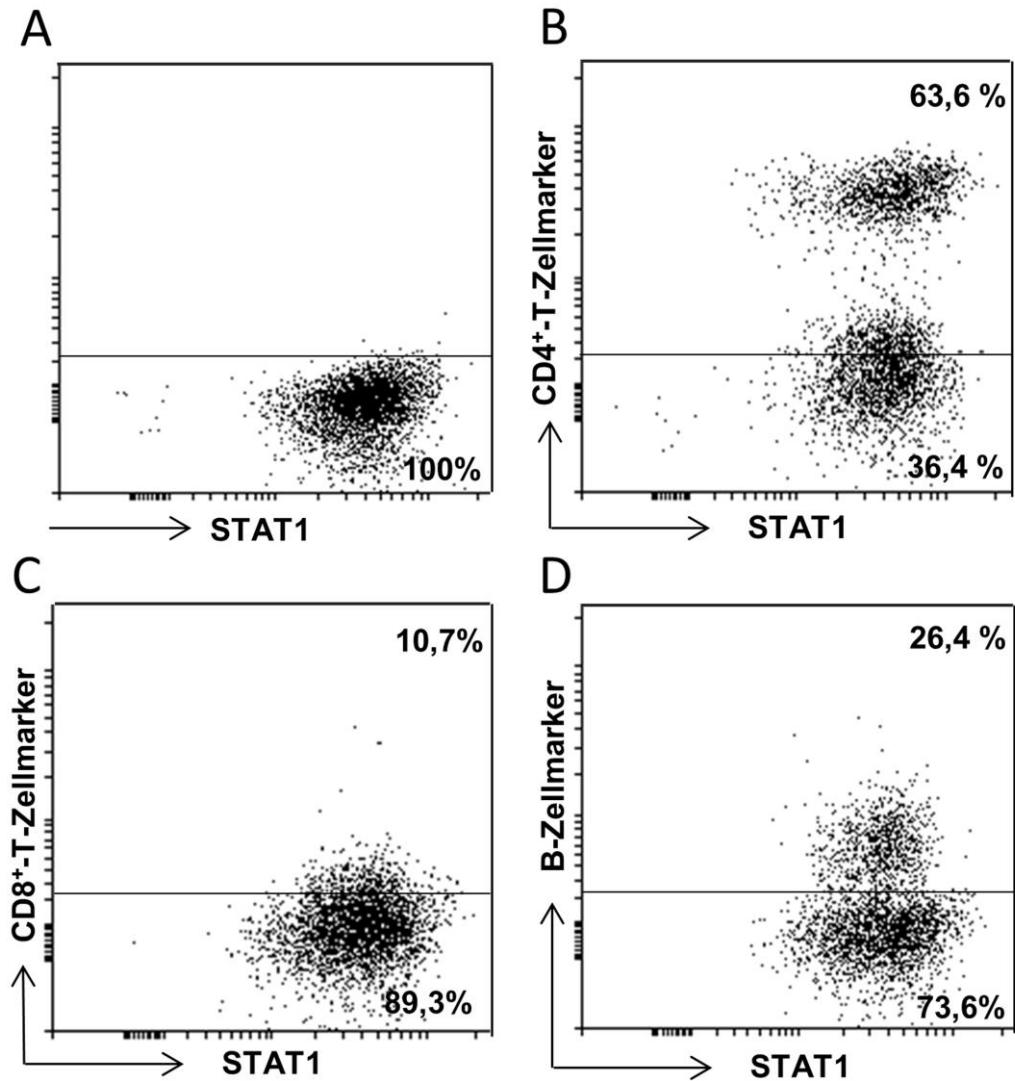


Abb. 4.16: Expression von STAT1 in unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen

Die Expressionsstärke von STAT1 in den PBL gesunder Pferde wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt und ist im Dotplot dargestellt. Im unteren Abschnitt sind einfach positive Zellen dargestellt, im oberen Abschnitt Zellen, die sowohl das jeweilige Markerantigen exprimieren als auch STAT1. Die Einfachfärbung (A) mit einem anti-STAT1-Antikörper bestätigt die Expression des Proteins auf allen Lymphozyten innerhalb des Gates. Die Dotplots B-D zeigen die Verteilung der STAT1-Expression in den CD4⁺-T-Zellen (B) und den CD8⁺-T-Zellen (C) sowie in B-Zellen (D).

Hinsichtlich der Expressionsstärke konnte kein signifikanter Unterschied in den unterschiedlichen Subpopulationen festgestellt werden (vgl. Abb. 4.17). Die geo MFI der STAT1 Expression lag in den CD4⁺-T-Zellen und den CD8⁺-T-Zellen auf vergleichbarer Höhe, die geo MFI der STAT1 Expression in den B-Zellen war geringgradig niedriger.

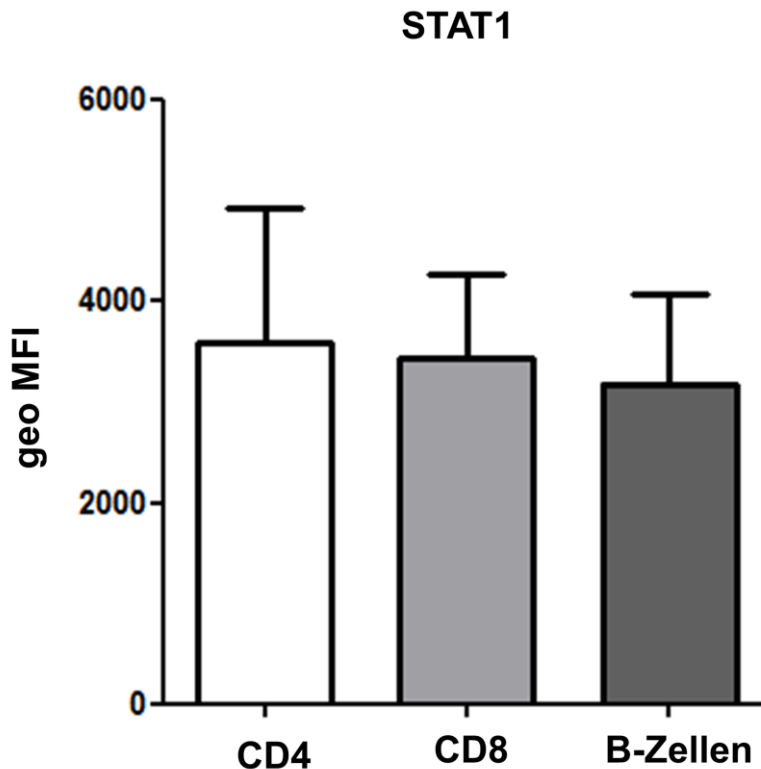


Abb. 4.17: Phänotypisierung der STAT1-Expression bei Lymphozytensubpopulationen gesunder Pferde. Mittels Durchflusszytometrie wurden Expressionsunterschiede bei CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen analysiert. Die geo MFI Werte der STAT1 Expression auf den PBL von gesunden (n=3) Tieren wurden statistisch ausgewertet. Zwischen der Expressionsstärke in den unterschiedlichen Populationen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

4.5.2 Vergleichbare STAT1-Abundanz in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde

Da die Rolle von STAT1 nun auch in PBL an ERU erkrankter Pferde näher charakterisiert werden sollte, dienten weitere Untersuchungen zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts von STAT1 in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Zu diesem Zweck wurde die Expression von STAT1 in Lymphozyten von gesunden und an ERU erkrankten Pferden mittels Western Blots bestimmt. Die Expression des Proteins war bei beiden Phänotypen nahezu identisch (vgl. Abb. 4.18).

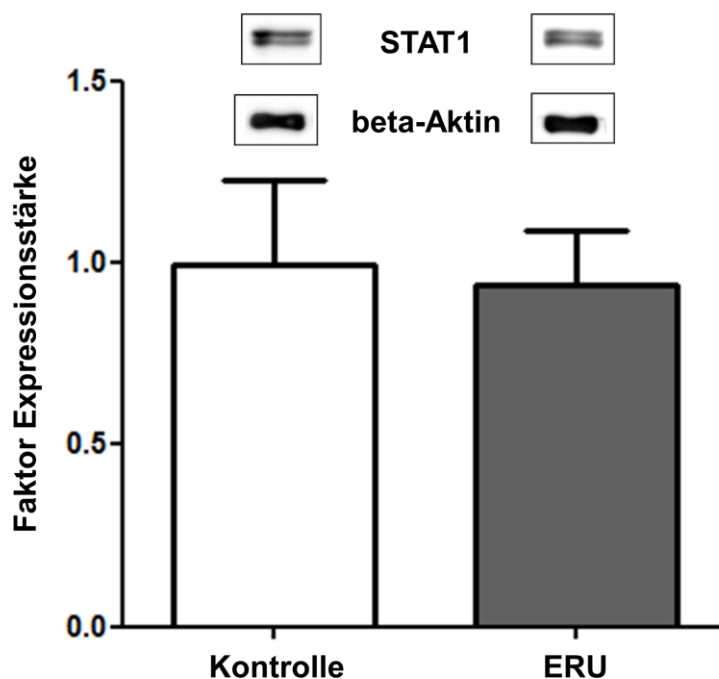


Abb. 4.18: Expression von STAT1 in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde im Western Blot. Die Expression des Transkriptionsfaktors STAT1 in den Lymphozyten gesunder (n=12) und an ERU erkrankter (n=18) Pferde wurde im Western Blot analysiert und nach Normalisierung mit beta-Aktin quantifiziert. Es wurde eine vergleichbare Abundanz von STAT1 nachgewiesen. Dargestellt sind die auf den Faktor 1 normierten Daten der Kontrollgruppe (weiße Säule) und die darauf bezogenen Werte der erkrankten Pferde (graue Säule).

4.5.3 Differentielle Expression von phosphoryliertem STAT1 in den Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden

Da uns funktionelle Unterschiede zwischen den PBL gesunder und an ERU erkrankter Tiere interessieren, untersuchten wir als nächstes, ob bei gleicher Abundanz eine unterschiedliche Aktivierung des Proteins vorliegen könnte. Deshalb wurde bei denselben Tieren die Expression von phosphoryliertem STAT1 (pSTAT1) im Western Blot untersucht. Hierbei konnte ein deutlicher Unterschied in der Expressionsstärke von pSTAT1 bei erkrankten Pferden im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren festgestellt werden. Das Protein pSTAT1 wurde bei erkrankten Pferden 1,4-fach stärker exprimiert als in den PBL gesunder Pferde (vgl. Abb. 4.19).

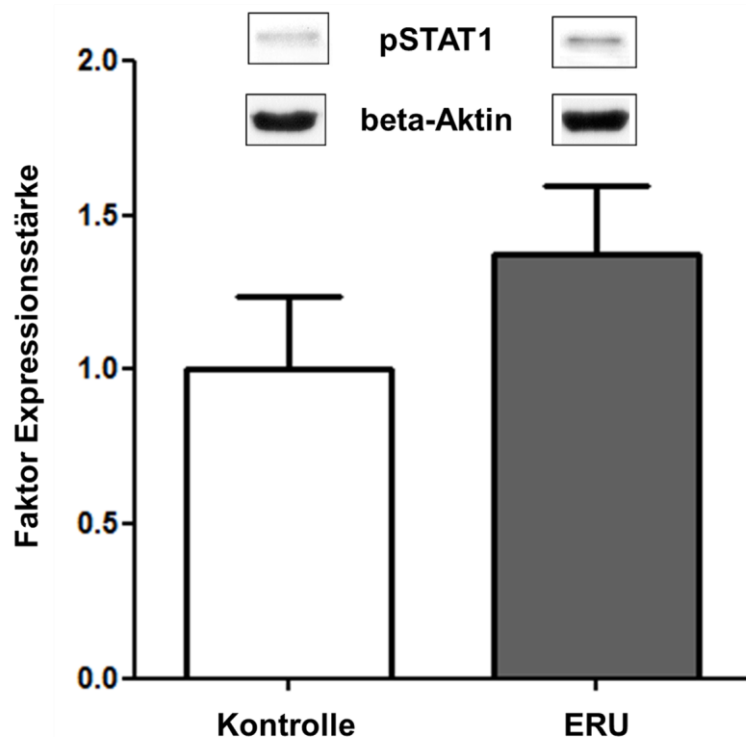


Abb. 4.19: Expression von pSTAT1 in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde im Western Blot. Die Expressionsunterschiede von pSTAT1 in PBL gesunder (n=12) und an ERU erkrankter (n=18) Pferde zeigten eine differentielle Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Die Expression des Proteins wurde im Western Blot analysiert und nach Normalisierung auf beta-Aktin quantifiziert. Die ermittelten Werte der erkrankten Gruppe wurden zusammengefasst und zu denen der Kontrollgruppe (= Faktor 1) in Bezug gesetzt. pSTAT1 wurde von den Lymphozyten der ERU Pferde 1,4-fach stärker exprimiert. Der Unterschied war nicht signifikant.

4.5.4 Differentielle Expression von ILK in Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden

Der zweite identifizierte Signaltransduktions-Interaktionspartner von Septin 7 und DOCK8 war ILK. Auch die Expression von ILK in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde wurde im Western Blot untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Analyse bei 17 gesunden und 28 an ERU erkrankten Pferden durchgeführt. In den Lymphozyten der erkrankten Tiere konnte mehr ILK detektiert werden als in den PBL der Kontrollgruppe. Es ergab sich eine signifikant (* $p < 0,05$) 1,4-fach stärkere Expression von ILK in den Lymphozyten der an ERU erkrankten Pferde (vgl. Abb.4.20).

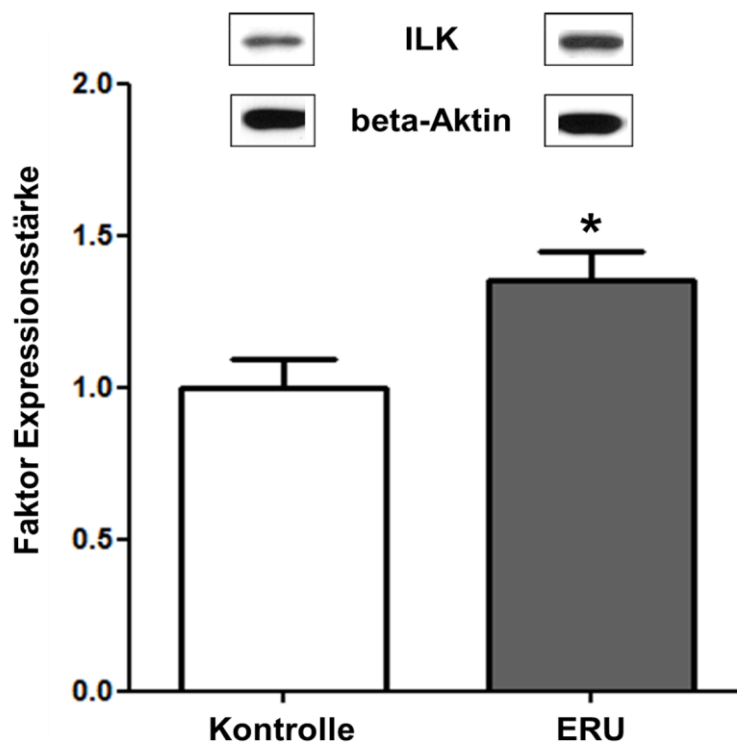


Abb. 4.20: Expression von ILK in PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde im Western Blot. Expressionsunterschiede von ILK in Lymphozyten gesunder (n=17) und an ERU erkrankter (n=28) Pferde im Western Blot zeigten eine verstärkte Expression des Proteins in PBL erkrankter Pferde. Nach Quantifizierung und Normalisierung auf beta-Aktin wurden die Daten der Kontrollgruppe auf den Faktor 1 normalisiert und die Werte der erkrankten Gruppe dazu in Bezug gesetzt. Es ergab sich eine signifikant 1,4-fach stärkere Expression von ILK in den Lymphozyten der an ERU erkrankten Pferde (* $p < 0,05$).

5 DISKUSSION

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine hochprävalente inflammatorische Augenerkrankung des Pferdes, die unbehandelt zum vollständigen Visusverlust des betroffenen Auges führt (Deeg et al., 2002a, Gilger and Michau, 2004). Die Erkrankung stellt durch ihren spontanen Charakter, der durch einen progressiven Verlauf mit schmerzhaften Entzündungsschüben gekennzeichnet ist, ein überaus geeignetes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen (HAU) dar (Deeg et al., 2008). Sowohl die ERU als auch die HAU sind immunmedierte Erkrankungen, bei denen vor allem eine bestimmte Subpopulation von Lymphozyten, die autoreaktiven T-Zellen, die Hauptrolle spielen (Deeg et al., 2002a, Caspi, 2010). Proteomische Analysen equiner Lymphozyten konnten in der Vergangenheit hochinteressante Erkenntnisse über eine differentielle Expression unterschiedlicher Proteine bei an ERU erkrankten Pferden liefern (Degroote et al., 2012, Degroote et al., 2014, Degroote et al., 2017). Um die Funktionen dieser Proteine näher zu charakterisieren ist es hilfreich, ihre Interaktionsnetzwerke innerhalb der Zelle zu untersuchen. Die zytoskelettale GTPase Septin 7 ist eines dieser, bei PBL an ERU erkrankter Pferde, differentiell exprimierten Proteine (Degroote et al., 2014).

Die proteomische Analyse des Interaktionsnetzwerks von Septin 7 in equinen Lymphozyten war im Hinblick auf die nähere funktionelle Charakterisierung des Proteins ein gewinnbringender Ausgangspunkt dieser Arbeit. Trotz zahlreicher Studien zur Funktion von Septinen in den letzten Jahren sind die exakten molekularen Mechanismen und physiologischen Funktionen dieser Proteine bis heute ungeklärt (Nakahira et al., 2010, Abbey et al., 2016). Da Septinkomplexe und -filamente eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von zellulären Signalen einnehmen, ist die Identifikation der Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 ein wertvoller Beitrag, um molekulare und zelluläre Funktionen des Proteins zu bestimmen (Nakahira et al., 2010). Aus diesem Grund untersuchten wir mittels massenspektrometrischer Analysen Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 mit Hilfe des in unserer Arbeitsgruppe entwickelten monoklonalen anti-Septin 7-Antikörpers (Burkhardt, 2015) erstmalig in Pferdelymphozyten. Die labelfreie LC-MS/MS Massenspektrometrie ermöglichte die Identifikation von 73 Interaktionsproteinen von Septin 7 in equinen PBL (vgl. Kap. 4.1). Unter den

Interaktionspartnern befanden sich neben der Positivkontrolle Septin 7 auch weitere Septine (Septin 2, Septin 9, Septin 11). Diese durch Septin 7-Interaktionen gebildeten Komplexe mit den von uns identifizierten Septinen sind Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten und beim Menschen eingehend untersucht (Nakahira et al., 2010, Serrao et al., 2011). Anhand unserer Befunde konnten wir die Interaktion zwischen Septin 7 und den drei Septinen nun auch erstmalig in equinen PBL beweisen. Über die Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 mit anderen Familien zugehörigen Proteinen ist dagegen bisher nur wenig bekannt. So wurden bei früheren Studien hauptsächlich Interaktionspartner identifiziert, die zur Septin-Familie gehören beispielsweise bei einer Untersuchung des Septin 7-Interaktoms in Septinen einer humanen cDNA-Bibliothek mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Systems. In dieser Studie stellte sich heraus, dass lediglich 9 % der identifizierten Interaktionspartner nicht der Familie der Septine angehörten (Nakahira et al., 2010).

In der hier durchgeführten Studie mit Immunpräzipitation und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse konnten hingegen zahlreiche, unterschiedlichen Familien und Funktionen zugeordnete, potenziell interagierende Proteine von Septin 7 bei Lymphozyten identifiziert werden. Von diesen Interaktionspartnern wurden zwei Proteine mit besonders interessanten Immunfunktionen zur näheren Charakterisierung ausgewählt (vgl. Kap. 4.1). Diese Proteine, HCLS1 und DOCK8, wurden bisher weder in Pferdelymphozyten beschrieben noch als Interaktoren von Septin 7. Diese neu detektierten Protein-Protein-Interaktionen ermöglichten es, weitere Rückschlüsse auf die Funktionen von Septin 7 in der Pferdezelle und damit auch über Pathogenese-assoziierte Mechanismen bei der ERU zu ziehen. Septin 7 nimmt in der Pathogenese dieser Erkrankung eine potentielle Schlüsselrolle ein, da die, in den Lymphozyten an ERU erkrankter Pferde, auftretende Expressionsminderung möglicherweise zu einer vermehrten Zellmigration durch die Blut-Retina-Schranke führt (Degroote et al., 2014). Wie Septin 7 kommen auch den Interaktionsproteinen HCLS1 (Urano et al., 2003) und DOCK8 (Zhang et al., 2014, Janssen et al., 2016) bedeutende Funktionen bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts zu. Eine gemeinsame Beteiligung an der Regulation zytoskelettaler Strukturen könnte im Verlauf der ERU für eine abweichende Zellmigration autoreaktiver Lymphozyten ursächlich sein. Darüber hinaus werden HCLS1 und DOCK8 bedeutende Funktionen im Immunsystem zugeordnet, weshalb die

Interaktion mit dem bei einer Autoimmunerkrankung differentiell exprimierten Septin 7 besonders interessant ist.

Da die grundlegenden Aspekte zu Funktionen und Expression von HCLS1 und DOCK8 in Pferdezellen vollkommen unbekannt waren, ermöglichten Expressionsanalysen die erstmalige Charakterisierung beider Proteine in equinen PBL. Das Protein HCLS1 wurde von uns in allen Populationen peripherer Blutleukozyten mit einer hohen Expressionsstärke detektiert (vgl. Kap. 4.1.1.1). Damit ergab sich in den equinen Blutzellen ein ähnliches Bild wie in humanen und murinen hämatopoetischen Zellen, in denen HCLS1 ubiquitär exprimiert wird (Dehring et al., 2011). Erstmals wurde die Expression von HCLS1 im Jahr 1989 in humanen hämatopoetischen Zellen beschrieben (Kitamura et al., 1989). Im Gegensatz zu seinem ubiquitär exprimierten Homolog Cortactin wurde HCLS1 vorrangig in hämatopoetischen und lymphatischen Zellen detektiert und mit zahlreichen Immunfunktionen assoziiert (Dehring et al., 2011, Uruno et al., 2003). So konnte gezeigt werden, dass HCLS1 über die Aktivierung des Arp 2/3-Komplexes einen bedeutenden Einfluss auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts nimmt (Uruno et al., 2003). Dadurch ist das Protein in zahlreiche immunologische Prozesse, wie die Bildung der immunologischen Synapse, Zelladhäsion und Migration involviert (Gomez et al., 2006, Uruno et al., 2003). Trotz einiger Untersuchungen zur Rolle von HCLS1 im Immunsystem sind die fundamentalen Fragen zur Expression und Regulation von HCLS1 noch nicht hinreichend geklärt.

Unsere Untersuchungen zur Expressionsstärke (geo MFI) von HCLS1 in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten ergaben Unterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen. Die geo MFI in den Monozyten fiel am höchsten aus, während die Expression von HCLS1 in Granulozyten und Lymphozyten ähnlich stark war (vgl. Kap. 4.1.1.1). Aufgrund der Schlüsselrolle von Lymphozyten in der Pathogenese der ERU war es das Ziel, die Expression von HCLS1 zunächst in den unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen gesunder Pferde zu untersuchen und damit eine Grundlage für weitere Expressionsanalysen zu schaffen (vgl. Kap. 4.1.1.1). In allen Lymphozytenpopulationen zeigte sich eine starke Expression des Proteins, in B-Zellen lag sie am höchsten. Diese Phänotypisierung des Proteins in equinen Lymphozyten konnte einen ersten Aufschluss über die physiologische Expression von HCLS1 in Pferdezellen bieten. Bisher wurde die differentielle Expression von HCLS1 in unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen in keinem

anderen Modell beschrieben. Mit der Expressionsanalyse von HCLS1 in den equinen Lymphozytensubpopulationen konnte demnach Grundlagenwissen generiert werden, dass möglicherweise auch auf andere Modelle übertragbar ist.

Da für uns die Pathogenese-assoziierten Mechanismen der HCLS1-Expression im Rahmen der ERU von Bedeutung waren, war es das Ziel weiterer Untersuchungen, die Expression des Proteins in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde miteinander zu vergleichen. In den Lymphozyten erkrankter Pferde konnte eine signifikant erhöhte Expressionsstärke (1,9-fach) von HCLS1 festgestellt werden (vgl. Kap. 4.1.1.2). Diese signifikant veränderte Proteinabundanz in den Zellen erkrankter Tiere könnte für Pathogenese-assoziierte Mechanismen relevant sein. Bisher ist nicht viel zur Auswirkung einer Expressionssteigerung des Proteins in Lymphozyten bekannt, jedoch lassen die Ergebnisse einiger Studien im HCLS1^{-/-} Mausmodell darauf schließen, dass eine differentielle HCLS1-Expression Einfluss auf die Zellmigration von hämatopoetischen Zellen nimmt (Dehring et al., 2011, Scielzo et al., 2010). Anhand dieses HCLS1^{-/-} Mausmodells wurde das Migrationsverhalten von dendritischen Zellen (DZ), die sich aus Monozyten und T- und B-Vorläuferzellen differenzieren, untersucht (Dehring et al., 2011). Dabei wurde mittels Video-Mikroskopie eine ungerichtete Zellbewegung dieser DZ beobachtet (Dehring et al., 2011). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass HCLS1 für die gerichtete, chemotaktische Zellmigration dendritischer Zellen von Bedeutung ist (Dehring et al., 2011). Eine beeinträchtigte Migration wurde auch bei B-Zellen von HCLS1^{-/-} Mäusen beobachtet (Scielzo et al., 2010). In diesem Modell war allerdings nicht die chemotaktische Zellmigration beeinträchtigt, sondern die spontane Zellbewegung (Scielzo et al., 2010). Hier ergab sich eine 8-fach geringere Migration von B-Zellen aus HCLS1^{-/-} Mäusen, verglichen mit den B-Zellen des Wildtyps (Scielzo et al., 2010). Im Umkehrschluss könnte das Auftreten einer HCLS1-Expressionssteigerung in den Lymphozyten an ERU erkrankter Pferde zu einer verstärkten Zellbewegung und einer vermehrten Einwanderung in intraokulare Strukturen führen. Da Lymphozyten bei der Pathogenese der ERU die Hauptrolle spielen, war für uns von Interesse, in welchen Subpopulationen die Expressionsänderungen detektiert werden können. Bei der Expressionsanalyse in den einzelnen Lymphozytensubpopulationen beider Phänotypen (gesund / ERU) wurde in den CD8⁺-T-Zellen erkrankter Pferde eine verstärkte Expression von HCLS1 detektiert. Die Expressionsstärke in CD4⁺-T-Zellen an ERU erkrankter Pferde

war im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren hingegen geringgradig vermindert. Eine deutliche Expressionssteigerung von HCLS1 wurde in den B-Zellen erkrankter Pferde nachgewiesen (vgl. Kap.4.1.1.2). Die Folgen einer Expressionsminderung von HCLS1 in CD4⁺-T-Zellen und einer Expressionssteigerung in CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen im Rahmen einer spontan auftretenden organospezifischen Autoimmunerkrankung sind bisher nicht bekannt. Anhand der im HCLS1^{-/-} Mausmodell ermittelten Funktionen des Proteins in den einzelnen Lymphozytensubpopulationen lassen sich jedoch mögliche Rückschlüsse auf Pathogenese-assoziierte Mechanismen bei an ERU erkrankten Pferden ziehen. So konnte gezeigt werden, dass HCLS1 in murinen T-Zellen Funktionen in der Stabilisierung von Aktin-Filamenten und der Bildung der immunologischen Synapse einnimmt (Gomez et al., 2006, Carrizosa et al., 2009). Eine veränderte Proteinabundanz in den T-Zellen an ERU erkrankter Pferde könnte also Auswirkungen auf die Organisation der Zellstruktur und die Regulation der Immunantwort haben. Des Weiteren konnte im HCLS1^{-/-} Mausmodell gezeigt werden, dass HCLS1 eine bedeutende Rolle beim B-Zell-Trafficking und -Homing einnimmt und die Infiltration von B-Zellen in Gewebe beeinflusst (Scielzo et al., 2010). Eine ausbleibende HCLS1-Expression führte dabei zu einer verminderten Zellmigration (Scielzo et al., 2010). Die von uns detektierte verstärkte Expression in den B-Zellen an ERU erkrankter Pferde könnte Einfluss auf die Zellbewegung nehmen. In bisherigen Studien wurden hauptsächlich autoreaktive CD4⁺-T-Zellen als die Zellen identifiziert, die im Verlauf der ERU die Blut-Retina-Schranke passieren und zur Zerstörung intraokularer Strukturen führen (Deeg et al., 2002a). Besonders interessant wäre deshalb die Charakterisierung des Proteinexpressionsmusters von HCLS1 der im Glaskörper, von an ERU erkrankten Pferden, vorliegenden vitrealen Zellen. Auf diese Weise wäre ersichtlich, ob die eingewanderten CD4⁺-T-Zellen das Protein ebenfalls vermindert oder verstärkt exprimieren.

Durch seine Rolle bei der Zellmigration stellt HCLS1 für die Erforschung der ERU ein hochinteressantes Protein dar. Eine funktionelle Charakterisierung des Proteins in der Pathogenese der ERU könnte anhand von *in vitro* Transmigrationsassays erzielt werden. In diesem Modell wäre es möglich, das Migrationsverhalten von equinen Leukozyten mit einer erhöhten und einer physiologischen HCLS1-Expression zu vergleichen. Die dabei erhobenen Befunde könnten einen Aufschluss über die Rolle des Proteins in einem Modell für die humane autoimmune Uveitis und damit für die

Pathogenese der ERU sowie darüber hinausgehende Erkenntnisse liefern. Zwar bietet das bisher genutzte HCLS1^{-/-} Mausmodell vielseitige Möglichkeiten zu funktionellen Untersuchungen des Proteins, allerdings sind aufgrund der eingeschränkten Übertragbarkeit auf andere Spezies Limitationen mit diesem Modell verbunden. Die genetisch veränderte Mauslinie kann eine spontan auftretende Abweichung der Proteinabundanz nicht vollständig widerspiegeln. Gegenüber dem Mausmodell bietet die Charakterisierung von HCLS1 in equinen Leukozyten einige Vorteile. Hier besteht die Möglichkeit, die Folgen einer abweichenden Expression des Proteins in einem überaus geeigneten Modell für die autoimmune Uveitis zu analysieren, das mit einer hohen Prävalenz und Komplexität einhergeht. Im Gegensatz zu transgenen Mausmodellen, bei denen das HCLS1-Gen ausgeschaltet wird und damit die Proteinexpression über die Regulation eines Gens beeinflusst wird, findet die Expressionsänderung von HCLS1 in den PBL an ERU erkrankter Pferde spontan statt. Insgesamt konnten wir durch die Expressionsanalysen von HCLS1 in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde erstmalig eine Expressionssteigerung von HCLS1 im Rahmen einer spontan auftretenden, organospezifischen Autoimmunerkrankung detektieren.

Neben HCLS1 wurde DOCK8, mittels Massenspektrometrie, von uns als neuer potentieller Interaktionspartner von Septin 7 identifiziert (vgl. Kap. 4.1). Die zusätzliche Verifikation dieser Protein-Protein-Interaktion durch eine erneute Immunpräzipitation mit nachfolgendem Western Blot bestätigte eindeutig die Interaktion von Septin 7 mit DOCK8 (vgl. Kap. 4.1.2.1). DOCK8 wurde in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten, die sich mit der Rolle des Proteins vorrangig in der humanen Immunantwort befassten (Tangye et al., 2016, Janssen et al., 2016). Erstmals wurde das Protein als Interaktor von humanem CD42 in einem Yeast-Two-Hybrid Screen entdeckt (Ruusala and Aspenstrom, 2004). Nur wenig später wurde die DOCK8-Defizienz, die auf einer Mutation im DOCK8-Gen beruht, als Auslöser für einen kombinierten Immundefekt, das autosomal-rezessive Hyper-IgE-Syndrom (AR-HIES), identifiziert (Zhang et al., 2009). Bei dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung sind schwere rezidivierenden Atemwegs- und Hautinfektionen, sowie das Auftreten eines erhöhten Serum-IgE-Spiegels charakteristisch (Zhang et al., 2009). Die Funktionen von DOCK8 wurden daraufhin im Mausmodell und anhand klinischer Verlaufsstudien untersucht. Dabei wurden dem Protein unter anderem eine Rolle in der Organisation

des Zytoskeletts (Janssen et al., 2016), der Erhaltung der Zellplastizität im Verlauf der Zellmigration von Lymphozyten (Zhang et al., 2014) und der Regulation der Immunantwort zugeordnet (Keles et al., 2016). Da die Funktion von DOCK8 in Pferdezellen vollkommen unbekannt war und es keine Informationen über die Rolle des Proteins in der equinen Immunantwort gab, dienten Expressionsanalysen equiner Blutzellen zur näheren Charakterisierung von DOCK8. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen konnten wir das Protein in allen Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten gesunder Pferde detektieren. Während die Expressionsstärke in Monozyten und Granulozyten ähnlich stark ausfiel, wurde das Protein in den Lymphozyten geringgradig schwächer exprimiert (vgl. Kap. 4.1.2.2). Ähnliche Unterschiede der DOCK8-Abundanz wurden in humanen Monozyten und Lymphozyten detektiert (Jing et al., 2014). Hier wurde die Expression des Proteins in unterschiedlichen Zellpopulationen gesunder Kontrollen und am DOCK8-Defekt erkrankter Patienten mittels Durchflusszytometrie und Western Blot gemessen (Jing et al., 2014). In den gesunden Kontrollen wurde DOCK8 in den Monozyten stärker abundant, als in B- und T-Lymphozyten nachgewiesen (Jing et al., 2014). Dies spricht für eine ähnliche Verteilung des Proteins in unterschiedlichen Spezies und macht die Untersuchung von DOCK8 in equinen Lymphozyten im Rahmen der ERU und darüber hinaus interessant.

Um die mögliche Rolle von DOCK8 in der Pathogenese der ERU zu charakterisieren, analysierten wir die Expression des Proteins in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Im Lysat peripherer Blutleukozyten erkrankter Pferde konnte von uns im Western Blot eine hoch signifikante Reduktion der DOCK8-Expressionsstärke auf 64 %, verglichen mit der Expressionsstärke in PBL gesunder Pferde, festgestellt werden (vgl. Kap. 4.1.2.3). Bisher wurde weder beim Pferd, noch bei anderen Spezies eine veränderte Abundanz von DOCK8 im Rahmen einer spontan auftretenden Autoimmunerkrankung beschrieben. Daher war die Expressionsminderung des Proteins bei an ERU erkrankten Pferden ein äußerst interessanter Befund, da eine reduzierte DOCK8-Expression Einfluss auf die Immunantwort nehmen könnte.

Um Pathogenese-assoziierte Mechanismen bei der ERU, die mit einer verminderten DOCK8-Expression einhergehen, näher zu untersuchen, sollten weitere Untersuchungen klären, in welchen Zellen die Expressionsunterschiede vorliegen. Da Lymphozyten in der Pathogenese der ERU eine Schlüsselrolle einnehmen und

auch die Expressionsminderung des DOCK8-Interaktorproteins Septin 7 in den Lymphozyten erkrankter Pferde nachgewiesen wurde (Degroote et al., 2014), analysierten wir die DOCK8-Expression vergleichend in den Lymphozytensubpopulationen gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Bei der Phänotypisierung von DOCK8 in den equinen Lymphozytensubpopulationen, konnten wir DOCK8 in allen CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und allen B-Zellen, sowohl gesunder als auch an ERU erkrankter Pferde detektieren (vgl. Kap. 4.1.2.2). Dieser Befund war von besonderem Interesse, da die Reduktion der Expressionsstärke in equinen PBL nicht auf einer ausbleibenden Expression in einzelnen Lymphozyten beruhte. Von Interesse war daher, ob das Verteilungsmuster des Proteins oder die Expressionsstärke von DOCK8 zwischen beiden Phänotypen abweicht. Das Verteilungsmuster von DOCK8 in den T- und B-Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde unterschied sich nicht, jedoch fiel in den Zellen erkrankter Pferde eine verminderte Abundanz des Proteins, vor allem in den B-Zellen auf. Dieser Befund weist eine Übereinstimmung zu bisherigen Erkenntnissen einer differentiellen DOCK8-Expression, in den Lymphozyten am DOCK8-Defekt erkrankter Patienten, auf. Bei dieser Gruppe lagen somatische Mutationen des DOCK8-Gens vor (Jing et al., 2014). Solche Mutationen hatten geringere Auswirkungen auf die DOCK8-Expression in Lymphozyten, als heterozygote Genmutationen, bei der die Expression in T-Zellen geringgradig vermindert war, in B-Zellen jedoch deutlich reduziert (Jing et al., 2014).

Weitere Analysen der DOCK8-Expressionsstärke in den Lymphozyten gesunder und an ERU erkrankter Pferde bestätigten unsere ersten Befunde eindeutig. In den T-Zellen zeigte sich eine geringgradige Reduktion der Expressionsstärke des Proteins vor allem in den CD4⁺-T-Zellen der erkrankten Tiere (vgl. Kap. 4.1.2.3). Die Expressionsminderung in dieser Zellpopulation war von besonderem Interesse, da in der Pathogenese der ERU, CD4⁺-T-Zellen eine Schlüsselrolle spielen. Eine Änderung des Proteinexpressionsmusters dieser Zellen könnte zu einer vermehrten Zellmigration durch die Blut-Retina-Schranke und einer veränderten T-Zell-Immunantwort beitragen. Eine solche Abweichung der Immunantwort von DOCK8-defizienten T-Zellen wurde in unterschiedlichen Studien, mit DOCK8-defizienten humanen und murinen T-Zellen beschrieben (Lambe et al., 2011, Zhang et al., 2014, Xu et al., 2017, Jin et al., 2016). Dabei fanden verschiedene Mausmodelle Verwendung, beispielsweise DOCK8^{pri/pri} und DOCK8^{cpm/cpm} -Stämme,

bei denen jeweils Loss-of-Function-Mutationen des DOCK8-Gens vorlagen, die in einer reduzierten Proteinexpression resultierten (Lambe et al., 2011, Randall et al., 2009). Des Weiteren wurden DOCK8^{-/-} Knock-Out-Mäuse, bei denen keine DOCK8-Expression detektierbar war, verwendet (Janssen et al., 2016). Die in unserer Studie erstmals beschriebene, spontan auftretende Verminderung der DOCK8-Expression im Rahmen einer Autoimmunerkrankung erweitert damit die bisherigen Erkenntnisse zu einer Veränderung der Abundanz und zur funktionellen Charakterisierung von DOCK8 in Immunzellen. Bisher wurde sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen eine Rolle von DOCK8 in einer Reihe Aktin-medierter T-Zellfunktionen beschrieben (Janssen et al., 2016). So wurden DOCK8 unter anderem wichtige Funktionen in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Aktin-Polymerisation und der Zusammenlagerung von F-Aktin-Filamenten zugeordnet (Janssen et al., 2016).

Damit könnte die Expressionsminderung von DOCK8 (vgl. Kap. 4.1.2.3), wie auch die des Interaktionspartners Septin 7 (Degroote et al., 2014), strukturelle Veränderungen bei den T-Zellen an ERU erkrankter Pferde bewirken. Die abweichende Organisation des Zytoskeletts könnte zum einen zu einer vermehrten Zellmigration beitragen, die eine bedeutende Rolle bei der ERU spielt, zum anderen aber auch in weitere immunologische Prozesse eingreifen.

So konnte gezeigt werden, dass T-Zellen von Patienten mit einem DOCK8-Defekt, sowie murine T-Zellen von DOCK8^{cpm/cpm} und DOCK8^{-/-} Mäusen, bei der Migration in Gewebe Deformationen des Zellkerns und Störungen ihrer Plastizität aufwiesen (Zhang et al., 2014). Während des Migrationsprozesses unterlagen die Zellen aufgrund ihrer Deformationen einem neu definierten Zelltod, der „*cytothripsis*“ (Zhang et al., 2014). Der Einfluss der ausbleibenden oder dysfunktionalen DOCK8-Expression auf die Plastizität der T-Zellen könnte auch im Hinblick auf die Pathogenese der ERU interessant sein, denn die Flexibilität ist ein entscheidender Faktor für die Funktion von T-Zellen.

Doch auch über die Folgen für die veränderte Zellmigration hinaus, hatte die ausbleibende DOCK8-Expression Auswirkungen auf die T-Zell-Immunantwort bei Mensch und Maus. Eine abweichende Immunantwort regulatorischer T-Zellen wurde durch einen Knockdown von DOCK8 in murinen Zellen beschrieben (Jin et al., 2016). Die mit DOCK8-siRNA gesilencierten Tregs produzierten deutlich weniger IL-10 und TGF- β als unbehandelte Zellen (Jin et al., 2016). Diese Zytokine hemmen die Proliferation und Differenzierung der T-Zell-Effektorfunktionen und stimulieren

FOXP3 (Jin et al., 2016). Bei FOXP3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Immunantwort von Tregs reguliert (Carbone et al., 2014). Eine verminderte Expression von FOXP3 wurde mit einer beeinträchtigten Proliferation von Tregs assoziiert, die in Autoimmunerkrankungen des Menschen beobachtet wurde (Carbone et al., 2014). Eine Expressionsminderung von DOCK8 in den PBL an ERU erkrankter Pferde könnte demnach Auswirkungen auf die Funktionen und Anzahl regulatorischer T-Zellen haben und damit eine autoinflammatorische Antwort fördern. Die Korrelation zwischen einer verminderten DOCK8-Expression und einer differentiellen Produktion antiinflammatorischer Zytokine im Verlauf der Erkrankung wäre daher für weitere Untersuchungen interessant. Eine Möglichkeit einen solchen Zusammenhang festzustellen, wäre zum einen die Analyse von IL-10, TGF- β und FOXP3 in DOCK8-defizienten equinen PBL. Zum anderen könnte DOCK8 in equinen PBL gehemmt und die Produktion der genannten Zytokine anschließend vergleichend mit unbehandelten Zellen untersucht werden. Die dabei generierten Daten könnten einen Aufschluss über die Auswirkungen einer verminderten DOCK8-Expression auf die physiologischen Funktionen immunsuppressiver Mechanismen im Rahmen der ERU geben.

Besonders interessant war auch die von uns detektierte Expressionsminderung von DOCK8 in den B-Zellen, der an ERU erkrankten Pferde. Hier konnte eine signifikante Reduktion der Expressionsstärke (geo MFI) von DOCK8 auf 56 %, verglichen mit der Expressionsstärke in PBL gesunder Pferde detektiert werden (vgl. Kap. 4.1.2.3). Mittlerweile wurden beim Menschen neben dem AR-HIES weitere Abwandlungen des DOCK8-Defekts beschrieben, die mit anderen Immunphänotypen einhergehen (Qin et al., 2016, Kienzler et al., 2016). So wurden kürzlich bei 7 Patienten, bei denen Symptome des AR-HIES beobachtet wurden, neue Punktmutationen und homozygote Deletionen des DOCK8-Gens beschrieben, die von einer stark verminderten IL-10-Produktion durch regulatorische B-Zellen (Bregs) begleitet wurden (Qin et al., 2016). Diese regulatorischen B-Zellen unterstützen die immunologische Toleranz und wirken immunsuppressiv (Stanic et al., 2015). Damit könnte die verminderte Expression von DOCK8 bei an ERU erkrankten Pferden ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen durch Bregs führen. IL-10 wird auch von Tregs produziert, deren immunsuppressive Funktionen durch einen Knockdown von DOCK8 in murinen Tregs ebenfalls beeinträchtigt sind (Jin et al., 2016). Das spricht für eine umfassende Rolle

von DOCK8 bei der Regulation von B- und T-Zellfunktionen, die gegen autoimmune Prozesse gerichtet sind.

Die Auswirkungen eines DOCK8-Defekts auf die Funktionen von B-Zellen wurden für DOCK8^{pri/pri} und DOCK8^{cpm/cpm} Mäuse gezeigt (Randall et al., 2009). Diese Mäuse, bei denen eine Loss-of-Function-Mutation des DOCK8-Gens vorlag, entwickelten keine Marginalzonen (MZ)-B-Zellen, die sich physiologisch in der Marginalzone der Milz befinden und ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort sind (Randall et al., 2009). Die MZ-B-Zellen werden sowohl als Teil der T-Zell-unabhängigen Immunantwort verstanden als auch als CD4⁺-T-Zell-stimulierende, Antigen-präsentierende Zellen. Es wurde eine Korrelation zwischen einer erhöhten Anzahl von MZ-B-Zellen und dem Auftreten unterschiedlicher autoimmuner Erkrankungen wie dem Sjögren-Syndrom diskutiert (Daridon et al., 2006, Shen et al., 2016). Ob sich die verminderte DOCK8-Expression beim Pferd ebenfalls auf die Entwicklung von marginalen B-Zellen auswirkt, wäre interessant. Weitere Untersuchungen in humanen B-Zellen an DOCK8-Defizienz erkrankter Patienten zeigten, dass DOCK8 für die TLR9 (Toll-like-Rezeptor 9)-medierte B-Zellproliferation und Antikörperproduktion essentiell ist (Jabara et al., 2012). In Patienten, bei denen kein DOCK8 exprimiert wurde, sprachen die B-Zellen auf den TLR9-Liganden CpG nicht suffizient an, woraufhin der Pyk-Src-Syk-STAT3 Signalweg und die davon abhängige B-Zellproliferation und IgM- und IgG-Synthese gestört war (Jabara et al., 2012). Dies resultierte in einer verminderten Produktion von Antikörpern.

Die signifikant verminderte Expressionsstärke in den B-Zellen an ERU erkrankter Pferde könnte, wie bei Maus und Mensch, eine veränderte Immunantwort nach sich ziehen und Einfluss auf die B-Zellproliferation und Antikörperproduktion nehmen. Vergleichende Analysen der IgM- und IgG-Produktion in equinen Lymphozyten mit einer physiologischen und einer spontan reduzierten DOCK8-Expression könnten weitere Hinweise darüber geben, ob die verminderte Expression des Proteins in der ERU Einfluss auf die Antikörperproduktion von B-Zellen nimmt.

Eine weitere Funktion von DOCK8 bei der Immunantwort konnte bei murinen B-Zellen beschrieben werden (Randall et al., 2009). In diesen Zellen ist DOCK8 für die Bildung der immunologischen Synapse durch die Bindung des Liganden ICAM-1 an das Integrin LFA-1 von großer Bedeutung (Randall et al., 2009). Eine verminderte DOCK8-Expression könnte demnach Auswirkungen auf die Funktionen von ICAM-1 haben. Dies wiederum ist für die Pathogenese der ERU besonders interessant, da

eine Expressionsänderung dieses Proteins bereits im Zusammenhang mit der autoimmunen Uveitis des Menschen und dem Modell, der experimentellen autoimmunen Uveitis, beschrieben wurde (Dewispelaere et al., 2015). Bei Patienten mit HAU und im EAU-Mausmodell wurde eine Expressionssteigerung von ICAM-1 sowohl in den Epithelzellen der retinalen Gefäße als auch in den Zellen des retinalen Pigmentepithels festgestellt (Dewispelaere et al., 2015). Dies könnte auf einer vermehrten Zytokinproduktion aktivierter Lymphozyten basieren, die im Laufe des Migrationsprozesses durch die Blut-Retina-Schranke auftritt. Die Expressionssteigerung von ICAM-1 resultiert bei der Maus in einer verstärkten Adhäsion von migrierenden Lymphozyten (Dewispelaere et al., 2015). Auch bei den infiltrierenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen konnte intraokular bei HAU-Patienten eine gesteigerte Expression von ICAM-1, verglichen mit augengesunden Kontrollen, detektiert werden (Martin et al., 2000). Interessanterweise war die Expression von ICAM-1 bei den peripheren Blutleukozyten von HAU-Patienten deutlich geringer als in den intraokularen Zellen (Martin et al., 2000).

Auf dieser Grundlage wäre die vergleichende Untersuchung der ICAM-1-Expression im Zusammenhang mit der DOCK8-Expression in den peripheren und intravitrealen Lymphozyten an ERU erkrankter Pferde möglicherweise besonders aufschlussreich. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse könnten die Rolle von DOCK8 bei der ICAM-1 vermittelten Adhäsion während der Migration autoreaktiver Lymphozyten näher charakterisieren.

Insgesamt erweitern unsere neuen Befunde zur differentiellen Expression von DOCK8 bei an ERU erkrankten Pferden das Spektrum der Erkrankungen, die durch eine abweichende DOCK8-Abundanz in Blutzellen charakterisiert sind. Noch nie wurde eine Expressionsminderung von DOCK8 im Zusammenhang mit einer spontan auftretenden organospezifischen Autoimmunerkrankung beschrieben. Jedoch wurde eine erhöhte DOCK8-Abundanz in einer aktuellen Studie mit der multiplen Sklerose und dem Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), assoziiert (Xu et al., 2017). Die Multiple Sklerose (MS) ist, wie auch die ERU, eine T-Zell-medierte Autoimmunerkrankung, bei der autoreaktive T-Zellen Strukturen des zentralen Nervensystems infiltrieren und dort zu Entzündungsschüben führen (Schlager et al., 2016). Gegensätzlich zu unseren Befunden zur Expressionsminderung von DOCK8 in den PBL an ERU erkrankter Pferde, wurde in den mononuklearen Zellen des peripheren Blutes von MS-Patienten ein erhöhter

mRNA- und Proteingehalt von DOCK8 festgestellt (Xu et al., 2017). Zusätzlich wurde eine signifikant erhöhte DOCK8-Proteinexpression mittels Immunoblot auch in den CD4⁺-T-Zellen von EAE-Mäusen in der akuten Phase der Inflammation im Vergleich zu der präsymptomalen- und Remissionsphase detektiert (Xu et al., 2017). Aus diesen Befunden wurde eine Korrelation zwischen DOCK8-Expression in T-Zellen und dem Schweregrad der EAU geschlossen (Xu et al., 2017). Folglich wurde anhand zwei unterschiedlicher Mausmodelle überprüft, ob eine verstärkte Expression des Proteins mit einer vermehrten Zellmigration und Infiltration von CD4⁺-T-Zellen korreliert. Verwendet wurden DOCK8^{pri/pri} Mäuse, bei denen eine Loss-of-function-Mutation des Primus-Gens die Guaninnukleotid-Exchange-Faktor (GEF)-Aktivität von DOCK8 blockiert, die für die Aktivierung von CDc42 notwendig ist (Xu et al., 2017). In diesem Modell wurde mit dem enzephalitogenen Peptid Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) in Freund's Adjuvanz eine EAE induziert und die CD4⁺-T-Zellen in ein Empfängertier transferiert (Xu et al., 2017). Vergleichend hierzu wurde der gleiche adoptive Transfer aus DOCK8^{pri/+} Mäusen (eine Kombination der DOCK8^{pri/pri} Mäuse mit dem Wildtyp) in ein natives Empfängertier durchgeführt (Xu et al., 2017). Es ist nicht beschrieben, ob in beiden Mausmodellen dann eine differentielle DOCK8-Expression detektiert wurde. Die CD4⁺-T-Zellen des DOCK8^{pri/pri} Modells lösten im Empfängertier einen weitaus mildereren Phänotyp aus, der sich hauptsächlich durch eingeschränkte Zellmigration und Infiltration in das Rückenmark äußerte (Xu et al., 2017). Daraus wurde geschlossen, dass sich ein Funktionsverlust von DOCK8 bei der Aktivierung von CDc42 in einer geringeren Zellmigration und damit in einem mildereren Phänotyp der EAE äußert (Xu et al., 2017). Anhand dieser artifiziellen Untersuchungen transgener Mäusestämme ist es nur bedingt möglich, festzustellen, ob eine erhöhte DOCK8-Expression tatsächlich zur verstärkten Zellmigration von CD4⁺-T-Zellen führt. Die Mutation des Primus-Gens führt in den Mäusen zu einer funktionellen Veränderung bei der Aktivierung von CDc42, die bei spontan auftretenden Erkrankungen bisher so nicht beschrieben ist. Des Weiteren wurde anhand dieser Studie postuliert, dass mit der reduzierten DOCK-Aktivität der DOCK8^{pri/pri}-Mäuse eine verminderte Aktivität von CDc42 einhergeht, die in einer reduzierten Zellmigration resultiert (Xu et al., 2017). In unseren Untersuchungen wurde CDc42 hingegen in den PBL an ERU erkrankter Pferde als Interaktionspartner von DOCK8 detektiert (vgl. Kap. 4.3). Dies könnte darauf hindeuten, dass gerade im Verlauf der Erkrankung eine vermehrte Aktivität

von CDc42 in Interaktion mit DOCK8 auftritt, die zu einer vermehrten T-Zell-Migration führt.

Trotz des wachsenden Interesses an DOCK8, in zahlreichen kürzlich veröffentlichten Studien (Janssen et al., 2016, Keles et al., 2016, Xu et al., 2017), sind die Immunfunktionen des Proteins noch nicht vollständig geklärt. Um die Funktion von DOCK8 in Pferdezellen näher zu charakterisieren, wurden mittels Immunpräzipitation und massenspektrometrischer Analyse Interaktionspartner von DOCK8 identifiziert (vgl. Kap. 4.2). Unter den 126 interagierenden Proteinen, war auch ein von uns bereits im Zusammenhang mit der ERU beschriebener Kandidat, Talin 1 (Degroote et al., 2012, Degroote et al., 2013) (vgl. Kap. 4.2). Eine Protein-Protein-Interaktion zwischen DOCK8 und Talin 1 ist beim Menschen bereits in natürlichen Killerzellen beschrieben (Ham et al., 2013). Bei der Untersuchung dieser Interaktion wurde mittels Immunpräzipitation ein DOCK8-Komplex in YTS-Zellen, einer humanen NK-Tumor-Zelllinie, mittels nachfolgender massenspektrometrischer Analyse identifiziert (Ham et al., 2013). Zu diesem Komplex gehörten, neben DOCK8 selbst, das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein und Talin 1 (Ham et al., 2013). Bei der Untersuchung des DOCK8-Interaktoms im Rahmen dieser Arbeit wurden neben Talin 1 noch 124 weitere potenzielle Interaktionspartner identifiziert (vgl. Kap. 4.2). Dies zeigt, dass DOCK8 ein weitaus größeres Interaktionsnetzwerk aufweist, als bisher beschrieben. Die Charakterisierung der interagierenden Proteine von DOCK8 ermöglicht es, eine tiefergehende Analyse der funktionellen Bedeutung von DOCK8 in equinen PBL zu erzielen. Talin 1 ist ein Protein, das über die Bindung an β -Integrin als wichtiges Signalpeptid bei der Integrin-Aktivierung fungiert (Tadokoro et al., 2003, Nieswandt et al., 2007, Calderwood et al., 2002). In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte eine signifikante Expressionsminderung von Talin 1 in den Granulozyten an ERU erkrankter Pferde festgestellt werden (Degroote et al., 2012). Diese Befunde ließen auf eine veränderte β -Integrin Aktivierung in den Granulozyten an ERU erkrankter Pferde schließen, die Einfluss auf zahlreiche Prozesse wie Zelladhäsion, Zellmigration und die Regulation der Immunantwort nimmt (Degroote et al., 2012). DOCK8 könnte eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Talin 1-Funktionen einnehmen und damit ein Schlüsselement im Netzwerk von Integrinen und Aktin-Zytoskelett darstellen. Besonders interessant ist die Rolle der beiden interagierenden Proteine DOCK8 und Talin 1 in den T-Zellen gesunder und erkrankter Pferde. Die Bedeutung beider Proteine in der Regulation

des Zytoskeletts könnte im Rahmen der Pathogenese der ERU für die Funktionen von T-Zellen interessant sein. Die bisherigen proteomischen Analysen der T-Zellen an ERU erkrankter Pferde zeigten, dass vor allem Proteine, die entscheidend für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts sind wie Septin 7 (Degroote et al., 2012), HCLS1 (vgl. Kap. 4.1.1.2) oder DOCK8 (vgl. Kap. 4.1.2.3), differentiell exprimiert werden. Die Protein-Protein-Interaktion von DOCK8 und Talin 1 in equinen T-Zellen könnte bei einer reduzierten DOCK8-Expression demnach zu einer abweichenden Funktion von Talin 1 führen. Als Folge könnte eine veränderte Zelladhäsion, Zellmigration und Immunantwort bei an ERU erkrankten Pferden auftreten.

Des Weiteren befand sich unter den Interaktionspartnern von DOCK8 in equinen PBL auch HCLS1 (vgl. Kap. 4.2). Diese Protein-Protein-Interaktion wurde von uns erstmalig beschrieben. Dem F-Aktin Bindungsprotein HCLS1, das von uns bereits als Septin 7-Interaktorprotein identifiziert wurde (vgl. Kap. 4.1), werden zahlreiche Funktionen in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Zellmigration und der Bildung der immunologischen Synapse zugeordnet (Gomez et al., 2006, Carrizosa et al., 2009). HCLS1 weist zu seinem potentiellen Interaktionspartner DOCK8 funktionelle Gemeinsamkeiten auf. Beide Proteine nehmen eine Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und bei immunologischen Prozessen ein (Carrizosa et al., 2009, Janssen et al., 2016).

Über die Analyse der interagierenden Signaltransduktionsmoleküle in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde ermittelten wir die möglichen Funktionsunterschiede von DOCK8 und Septin 7 im Rahmen der Erkrankung. Interessanterweise konnten wir bei beiden Phänotypen abweichende Protein-Protein-Interaktionen von DOCK8 und Septin 7 identifizieren (vgl. Kap.4.3). Das lässt darauf schließen, dass durch beide Proteine im Verlauf der ERU Abweichungen in der Beeinflussung von inter- und intrazellulären Signalwegen auftreten. Dies könnte zum einen eine Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege von Septin 7 beziehungsweise DOCK8 beinhalten oder zum anderen eine abweichende Aktivierung der beiden Proteine durch interagierende Proteine. Unter den in PBL gesunder Pferde identifizierten potentiellen Interaktionspartnern von Septin 7, waren drei Signaltransduktionsmoleküle, in PBL an ERU erkrankter Pferde zusätzlich zwei weitere (vgl. Kap. 4.3.1). Diese zwei abweichenden Signaltransduktionsmoleküle, die in den PBL an ERU erkrankter Pferde identifiziert wurden, waren Ras Guanyl releasing protein 2 (RasGRP2) und CDc42 (vgl. Tab. 4.4).

CDc42 ist eine kleine GTPase, die in zahlreichen zellulären Signalwegen beteiligt ist und Prozesse, wie Zellmorphologie, Zellmigration, Endozytose und Zellzyklus reguliert (Joberty et al., 2001). Das Protein ist in Hefe und humanen Zellen bereits als Interaktionspartner von Septin 7 bekannt (Joberty et al., 2001, Sadian et al., 2013). Die bisherigen Studien zu dieser Interaktion konnten zeigen, dass CDc42 in Hefe und humanen Zellen eine bedeutende Funktion bei der Regulation von Septin 7 einnimmt (Joberty et al., 2001, Sadian et al., 2013). Die von uns erstmalig entdeckte Protein-Protein-Interaktion von CDc42 und Septin 7 in Pferdezellen lässt zunächst auf ähnlich strukturierte Komplexe von Septin 7 in equinen und humanen Zellen schließen. Jedoch wurde diese Interaktion ausschließlich in den PBL erkrankter Pferde nachgewiesen, nicht in den PBL gesunder Pferde. Ein Grund dafür könnte eine transiente Interaktion von Septin 7 und CDc42 in equinen PBL sein, die in den Zellen erkrankter Pferde Funktionsunterschiede bewirkt. Diese Unterschiede könnten auf einer abweichenden Aktivierung von Septin 7 durch CDc42 im Verlauf der ERU basieren.

Einen weiteren Hinweis auf eine differentielle Aktivierung von Septin 7 in den PBL erkrankter Pferde gab die Identifikation des RasGRP2. Dieses Protein fungiert in humanen Zellen als Guanin-Nukleotid-Exchange Faktor, der kleine GTPasen wie Ras und Rap aktiviert (Takino et al., 2013). In humanen Lymphozyten wurden dem Protein durch die Interaktion mit Rap unter anderem eine Rolle bei der Stabilisierung der Bindung an Antigen-präsentierende Zellen zugeordnet (Stone, 2011). Detaillierte Studien zur Expression oder Funktionen des Proteins in humanen Zelllinien oder Zellen anderer Spezies existieren bisher nicht. Auch wurde bisher keine Assoziation von RasGRP2 mit immunmedierten Erkrankungen hergestellt (PubMed-Recherche: März 2017). Damit wurde das Protein von uns erstmalig im Zusammenhang mit einer Autoimmunerkrankung detektiert. Wie auch die von RasGRP1 aktivierten Proteine Ras und Rap, stellt Septin 7 eine GTPase dar, weshalb diese Interaktion besonders interessant ist. Bisher wurde keine Protein-Protein-Interaktion zwischen RasGRP2 und Septin 7 beschrieben (PubMed-Recherche: März 2017). Auch zur Funktion in equinen Leukozyten war über dieses Protein nichts bekannt. Diese von uns erstmals detektierte Protein-Protein-Interaktion zwischen RasGRP2 und Septin 7 in den PBL erkrankter Pferde könnte darauf hindeuten, dass RasGRP2 im Verlauf der Pathogenese eine Rolle bei der Aktivierung von Septin 7 spielt. Zukünftig könnten differentielle

Expressionsanalysen von RasGRP2 in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde neue Hinweise über die Expressionsstärke in unterschiedlichen Zellpopulationen im Rahmen einer spontan auftretenden Autoimmunerkrankung erzielen.

Auch unter den Protein-Protein-Interaktionen von DOCK8 gab es Abweichungen der interagierenden Signaltransduktoren zwischen den PBL gesunder und erkrankter Pferde. Während in den PBL gesunder Pferde fünf interagierende Signaltransduktionsmoleküle von DOCK8 identifiziert wurden, waren es bei an ERU erkrankten Pferden insgesamt zehn. Interessanterweise gehörten die bei an ERU erkrankten Pferden zusätzlich detektierten Interaktionspartner hauptsächlich Molekülen an, die Einfluss auf die Aktivität von GTPasen ausüben. Darunter waren Guanine nucleotide-binding protein G(I) subunit alpha-2, Ras related protein RAP-1B und Ras GTPase-activating protein 3, die von uns erstmalig in equinen Zellen detektiert wurden. Diese Proteine gehören zur Ras-Superfamilie der GTP-bindenden Proteine (Vigil et al., 2010). Zu dieser Familie gehören auch GTP-bindende Rho-Proteine, deren Interaktion mit DOCK8 bereits bekannt ist (Ruusala and Aspenstrom, 2004). Unter den neu identifizierten Interaktionspartnern befanden sich in den PBL an ERU erkrankter Pferde GTPase-aktivierende Proteine, die durch die Hydrolyse von GTP zu GDP am G-Protein eine inaktivierende Funktion einnehmen (Vigil et al., 2010). Interessanterweise fungiert DOCK8 als Guanosine triphosphate Exchange Factor (GEF), der einen Gegenspieler zu GTPase-aktivierenden Proteinen darstellt (Ruusala and Aspenstrom, 2004). Eine vermehrte Interaktion zwischen DOCK8 und GTPase-aktivierenden Proteinen in den PBL an ERU erkrankter Pferde könnte möglicherweise auf eine Hemmung der GEF-Aktivität von DOCK8 hindeuten und Abweichungen in der Signaltransduktion hervorrufen.

Unter den in beiden Phänotypen auftretenden DOCK8-Interaktoren waren weitere Signaltransduktionsmoleküle, die aufgrund ihrer beschriebenen Funktionen für die Pathogenese der ERU interessant sein können. Einer dieser DOCK8-Interaktionspartner, der sowohl in den PBL gesunder, als auch in den PBL an ERU erkrankter Pferde identifiziert wurde, war die Janus-Kinase 3 (JAK-3). Diese Tyrosin-Protein-Kinase erfüllt essentielle Funktionen in der zellulären Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen (Haan et al., 2011). JAK3 wird von Zytokinen, die γc -Rezeptoren aufweisen, aktiviert und stellt somit Bindungsstellen für STAT-Proteine bereit (Gomez-Valades et al., 2012). Der JAK3-STAT-Signalweg ist ein

bedeutender Schritt für immunologische Prozesse und Störungen dieser Signalübertragung führen zu Immundefekten (Ripoll et al., 2016). Die Interaktion von JAK3 und DOCK8 stellt einen sehr interessanten Befund dar und eine funktionelle Charakterisierung dieser deskriptiven Daten im Rahmen der ERU könnte in zukünftigen Studien weitere Erkenntnisse über die Signalwege von DOCK8 und JAK3 im Laufe einer spontan auftretenden Autoimmunerkrankung liefern. Eine Möglichkeit die Rolle von JAK3 im Rahmen der ERU näher zu charakterisieren, wäre eine differentielle Expressionsanalyse des Proteins in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Auf diese Weise könnten erste Hinweise darüber gewonnen werden, ob JAK3 unterschiedlich exprimiert wird und damit auch Folgen für die zelluläre Signalübertragung im JAK3-STAT-Signalweg entstehen.

Ein weiteres Interaktorprotein von DOCK8, das ebenfalls am JAK-STAT-Signalweg mitwirkt, war STAT1. Das Protein wurde nicht nur in den PBL erkrankter Pferde als DOCK8-Interaktorprotein identifiziert, sondern auch als Septin 7-Interaktorprotein in den PBL beider Phänotypen (vgl. Kap. 4.3). Beim Menschen werden STAT1, als zytokinreguliertem Transkriptionsfaktor, in Lymphozyten bedeutende Funktionen in der Signaltransduktion zugeordnet (Kuuliala et al., 2016). Eine besonders interessante Funktion von STAT1 im Hinblick auf die Pathogenese der ERU ist die bedeutende Rolle des Proteins in murinen Lymphozyten bei der Differenzierung von Th1-Effektorzellen und bei der Hemmung von Th17-Zellen (Stumhofer et al., 2006). Das Protein wurde erstmalig von uns als Interaktionspartner sowohl von Septin 7 in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde als auch von DOCK8 in den PBL erkrankter Tiere identifiziert (vgl. Kap. 4.3). Da zum einen die Beteiligung einer Th1-Immunantwort (Gilger et al., 1999) und zum anderen auch die Ausbildung einer Th17-Immunantwort bei der ERU diskutiert wird (Regan et al., 2012), ist die Identifikation von STAT1 als Interaktor von DOCK8 und Septin 7 in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. In humanen T-Zellen wurde eine Protein-Protein-Interaktion von DOCK8 und einem anderen Protein der STAT-Familie, STAT3, beschrieben (Keles et al., 2016). Diese Interaktion war von großem Interesse, da eine Loss-of-Function-Mutation des STAT3-Gens mit der autosomal dominanten Form des HIES assoziiert ist und damit eine Homologie zum DOCK8-Defekt aufweist (Keles et al., 2016). In beiden Krankheitsbildern sind Haut- und Atemwegsinfektionen und ein hoher IgE-Spiegel charakteristisch (Keles et al., 2016). Eine weitere Gemeinsamkeit beider Syndrome ist die eingeschränkte

Differenzierung von Th17-Zellen (Tangye et al., 2016, Keles et al., 2016). Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass DOCK8 in seiner Funktion als Guanin-Exchange-Faktor die Aktivierung und nukleare Translokation von STAT3 mediert und damit auch die Zytokin-abhängige Differenzierung zu Th17-Zellen beeinflusst (Keles et al., 2016). Damit wurden in dieser Studie Informationen über die Rolle von DOCK8 in einem STAT-Signalweg generiert, die sich auf die Differenzierung der Th-Zellen auswirkt (Keles et al., 2016). Es konnte dabei ausschließlich eine Protein-Protein-Interaktion zwischen DOCK8 und STAT3 nachgewiesen werden, jedoch keine Interaktion zwischen DOCK8 und STAT1 (Keles et al., 2016). Die Untersuchung dieser Protein-Protein-Interaktionen erfolgte nicht wie im Rahmen unserer Arbeit mittels Immunpräzipitation und massenspektrometrischer Analyse, sondern ausschließlich mittels Ko-Immunpräzipitation und anschließender Darstellung im Western Blot (Keles et al., 2016). Die in unserer Arbeit angewandte Methode zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen ist ein sehr effektives und sensitives Verfahren, das gegenüber dem Western Blot einige Vorteile aufweist. Nach der Identifikation der Protein-Protein-Interaktion mittels Immunpräzipitation und nachfolgender LC-MS/MS Massenspektrometrie, wurde die Interaktion der Proteine DOCK8 und Septin 7 mit STAT1 durch erneute Immunpräzipitation und Darstellung im Western Blot eindeutig verifiziert (vgl. Kap. 4.4.2). Durch die Identifikation von STAT1 als Interaktionspartner von DOCK8 und Septin 7 sowohl mittels Massenspektrometrie als auch im Western Blot in zwei unabhängigen Immunpräzipitationen, konnten wir das Spektrum der bisher beschriebenen Protein-Protein-Interaktionen erweitern.

Insgesamt ermöglichte die Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von Septin 7 und DOCK8 mit Signaltransduktionsmolekülen die Identifikation neuer, noch nie beschriebener Interaktionen. Für eine nähere Charakterisierung der Interaktionsproteine, die möglicherweise weitere Hinweise auf Pathogenese-assoziierte Mechanismen geben kann, kämen mehrere interessante Kandidaten in Frage. So wären Expressionsanalysen von Proteinen wie RasGRP2, JAK3 sowie STAT1 und ILK besonders interessant, da diese Kandidaten bedeutende Funktionen in der zellulären Signalübertragung und im Immunsystem einnehmen. Jedoch stehen wir bei unseren Experimenten mit equinen PBL immer wieder technischen Herausforderungen gegenüber, die durch Limitationen spezifischer gegen das Pferd gerichteter Antikörper bedingt sind. Aus diesem Grund wählten wir

für eine weitere Charakterisierung STAT1 und ILK aus. Für deren Expressionsanalyse standen Antikörper zur Verfügung, bei denen eine Kreuzreaktivität mit equinem STAT1 und ILK beschrieben ist.

Aufgrund der umfassenden Funktionen von STAT1, das bei der Differenzierung der Th-Immunantwort entscheidend beteiligt ist (Stumhofer et al., 2006), war die Expressionsanalyse des Proteins in den PBL gesunder und erkrankter Pferde von Interesse, um Hinweise auf Pathogenese-assoziierte Mechanismen bei der ERU zu gewinnen. Das Protein konnte in allen Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten gesunder Pferde mit einer hohen Expressionsstärke detektiert werden (vgl. Kap. 4.5.1). Um herauszufinden, ob STAT1 in der Pathogenese der ERU möglicherweise eine abweichende Immunantwort auslöst, war vor allem die differentielle Expressionsanalyse des Proteins in equinen PBL von Interesse (vgl. Kap. 4.5.2). STAT1 wurde in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde ohne Abweichungen der Expressionsstärke detektiert (vgl. Kap. 4.5.2). Interessanterweise wurde jedoch in den PBL erkrankter Pferde eine verstärkte Phosphorylierung von STAT1 am Tyrosin 701 (Tyr 701) detektiert (vgl. Kap. 4.5.3). Beim Pferd ist bisher nicht bekannt, welche Folgen diese Phosphorylierung für die Funktionen von STAT1 hat. Beim Menschen führt die Phosphorylierung am Tyrosin 701 zur Aktivierung von STAT1 (Ren et al., 2016). Eine solche Aktivierung von STAT1 kann im Verlauf des JAK/STAT-Signalwegs initiiert werden (Alves de Medeiros et al., 2016). Dieser Signalweg ist für die zelluläre Immunfunktion essentiell, da hier Informationen extrazellulärer Signale in den Zellkern weitergeleitet werden (Hurtado-Guerrero et al., 2017). Dort wird über die Transkription der DNA eine Effektorfunktion ausgelöst (Alves de Medeiros et al., 2016). Die Signale werden durch die Bindung von Zytokinen, wie Interferone und Interleukine, an ihre spezifischen Transmembranrezeptoren ausgelöst und initiieren die Aktivierung der JAK-Proteine (Alves de Medeiros et al., 2016). Die aktivierten JAK-Proteine phosphorylieren Tyrosinreste an den Rezeptoren und bilden damit Bindungsstellen für STAT-Proteine (Alves de Medeiros et al., 2016). Die STAT-Proteine werden durch diese Bindung wiederum von JAK-Proteinen phosphoryliert und lösen im nun aktivierten Zustand die Transkription am Zellkern aus (Alves de Medeiros et al., 2016). Aus murinen Zelllinien ist bekannt, dass die Aktivierung von STAT-Proteinen im Allgemeinen eine Signalkaskade zahlreicher Zytokine auslöst und eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung von Th-Zellen aufweist (Fang et al., 2015). Bisher ist nicht bekannt,

welche Funktion STAT1 bei der Th-Zell-Differenzierung in Pferdezellen einnimmt. Im Mausmodell aber konnte gezeigt werden, dass IFN γ die Phosphorylierung von STAT1 initiiert, wodurch eine Transkription Th1-spezifischer Gene und die Expression von IL-12R β und T-bet ausgelöst wird (Afkarian et al., 2002). Durch ein positives Feedback verstärkt die Expression dieser Proteine wiederum die Differenzierung von Th1-Zellen (Afkarian et al., 2002). In weiteren Studien konnte anhand eines STAT1^{-/-} Mausmodells gezeigt werden, dass die Differenzierung von Th17-Zellen durch die STAT1-abhängige Produktion von IL-27 gehemmt wird (Stumhofer et al., 2006).

Ein Unterschied der Abundanz von pSTAT1 wurde beim Menschen bereits in Assoziation mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, der inflammatorischen Bowel Disease und der MS (Frisullo et al., 2006) beschrieben. In den T-Zellen von MS-Patienten wurde während eines inflammatorischen Schubs in der Durchflusszytometrie eine signifikante Expressionssteigerung von pSTAT1 festgestellt (Frisullo et al., 2006). Als Vergleich dienten die Expressionsstärke von pSTAT1 in den T-Zellen einer Kontrollgruppe und die ermittelte Expressionsstärke von pSTAT1 in den T-Zellen von MS-Patienten in der Remissionsphase (Frisullo et al., 2006). Die erhöhte Expressionsstärke von pSTAT1 geht in humanen und murinen Zellen mit einer Expressionssteigerung von T-bet einher, einem Transkriptionsfaktor, der in zahlreiche Prozesse der angeborenen und adaptiven Immunantwort involviert ist und die Differenzierung von Th1-Zellen initiiert (Kanhare et al., 2012). Indem T-bet über eine positive Feedback-Schleife die Produktion von IFN γ stimuliert und eine verstärkte Produktion von IL-12 auslöst, erfolgt eine vermehrte Bildung von Th1-Zellen, wobei dieser Prozess auch unabhängig von IFN γ stattfinden kann (Ylikoski et al., 2005). Die verstärkte Phosphorylierung von STAT1 in den PBL an ERU erkrankter Pferde könnte zu einer Th1-Immunantwort führen. Ein ähnlicher Befund wurde von unserer Arbeitsgruppe kürzlich im Rahmen immunhistologischer Untersuchungen von intraokularen Lymphfollikeln erhoben, die in den Augen an ERU erkrankter Pferde detektiert wurden (Kleinwort et al., 2016). Innerhalb der Lymphfollikel, in denen hauptsächlich CD4⁺-T-Zellen vorlagen, wurde ein hoher Anteil von pSTAT1⁺ T-Zellen detektiert, der wiederum für eine Beteiligung der Th1-Immunantwort in der Pathogenese der ERU sprach (Kleinwort et al., 2016). Eine weitere Protein-Protein-Interaktion der beiden Kandidatenproteine Septin 7 und DOCK8 wurde von uns erstmalig entdeckt. Das mit beiden Proteinen interagierende

Signaltransduktionsmolekül ILK erfüllt unter anderem, wie auch seine Interaktoren DOCK8 und Septin 7, essentielle Funktionen in der Organisation des Zytoskeletts von Leukozyten (Liu et al., 2005). Mittels Immunpräzipitation und nachfolgender Massenspektrometrie konnten wir das ko-präzipitierte Interaktorprotein von Septin 7 und DOCK8 in equinen PBL identifizieren und die Interaktion anschließend mittels erneuter Immunpräzipitation im Western Blot verifizieren. Damit gelang es uns erstmalig, ILK in Pferdeleukozyten zu detektieren (PubMed-Recherche: März 2017). Im Rahmen eines Yeast-Two-Hybrid Screens wurde ILK im Jahr 1996 als Interaktor von β -Integrin aus einer Plazenta-cDNA-Bibliothek entdeckt (Hannigan et al., 1996). Seitdem ist das ubiquitär exprimierte Protein aufgrund seiner umfassenden zellulären Funktionen Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. Der Komplex aus ILK, PINCH und den α - und β -Parvinen (IPP) fungiert als Signalplattform für Integrine, über die zahlreiche Signalwege und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts mediert werden (Honda et al., 2013). Der C-terminalen Kinase Domäne kommt in ihrer Funktion als Serin/Threonin Kinase noch eine weitere Bedeutung zu (Lange et al., 2009). Durch die Fähigkeit, eine Phosphorylierung anderer Signalmoleküle zu induzieren, greift ILK in wichtige zelluläre Prozesse ein (Lange et al., 2009).

Aufgrund der essentiellen Funktionen von ILK in Leukozyten interessierten uns mögliche Pathogenese-assoziierte Expressionsänderungen in den PBL an ERU erkrankter Pferde. Die differentielle Expressionsanalyse von ILK in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde ergab eine signifikant erhöhte Expressionsstärke des Proteins in den in PBL erkrankter Tiere (vgl. Kap. 4.5.4). Damit ist es uns erstmalig gelungen eine differentielle Proteinexpression von ILK im Rahmen einer Autoimmunerkrankung zu detektieren. Die differentielle Proteinexpression in den Leukozyten erkrankter Pferde könnte sich auf die zelluläre Signalübertragung und damit auf zahlreiche immunologische Prozesse auswirken. Die Auswirkungen einer differentiellen Expression von ILK konnten in humanen und murinen Zellen gezeigt werden (Liu et al., 2005, Friedrich et al., 2002). Die Expressionssteigerung hatte Auswirkungen auf die Zellbewegung von humanen Leukozyten. Dies macht den in den PBL erkrankter Pferde erhobenen Befund zur verstärkten Expression von ILK besonders interessant, da in der Pathogenese der ERU die Zellmigration eine bedeutende Rolle spielt.

In humanen Leukozyten konnte gezeigt werden, dass die PI3K-abhängige Aktivierung von ILK in diesen Zellen von Chemokinen induziert wird (Friedrich et al.,

2002). Eine Expressionssteigerung von ILK führte in dieser Studie zu einer reduzierten Adhäsion von Leukozyten an vaskuläre Endothelzellen, die im Laufe des transendothelialen Migrationsprozesses auftritt (Friedrich et al., 2002). Anhand von Untersuchungen im Mausmodell wurden, basierend auf den Befunden in humanen Leukozyten, die Folgen einer differentiellen ILK-Expression auf die Zellbewegung analysiert (Liu et al., 2005). Dafür wurden gewebsspezifische Knock-Out-Mausmodelle entwickelt, bei denen durch das Cre/loxP-System das ILK-Gen gezielt in dem zu untersuchenden Gewebe ausgeschaltet werden kann (Liu et al., 2005). Durch die Kombination einer ILK^{flox/flox} Mauslinie mit einer transgenen Lck-Cre⁺ Mauslinie, wurde eine T-Zell-spezifische Knock-Out-Mauslinie geschaffen, die es ermöglichte durch die Elimination der ILK-Expression die Funktionen des Proteins speziell in T-Zellen zu untersuchen (Liu et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die ausbleibende Expression von ILK unter anderem die Zellbewegung von T-Zellen beeinflusst (Liu et al., 2005). Die T-Zellen der ILK^{-/-} Mäuse zeigten eine 50% geringere Chemotaxis auf die Chemokine CXCL12 und CCL19 als die T-Zellen der Wildtyp-Mäuse (Liu et al., 2005). Dies könnte im Umkehrschluss auf eine vermehrte Zellbewegung von ILK-kompetenten Zellen und dementsprechend einer verstärkten Transmigration der PBL an ERU erkrankter Pferde hindeuten.

Neben der Rolle in der Zellmigration kommen ILK noch weitere zelluläre Funktionen zu. So konnte anhand des ILK-Knockout-Mausmodells gezeigt werden, dass ILK für das Überleben von T-Zellen essentiell ist (Liu et al., 2005). Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Thymozyten 6-8 Wochen alter Mäuse fiel eine verringerte Anzahl der doppelt positiven CD4⁺ CD8⁺- T-Zellpopulation im Thymus und eine 4-fach höhere Zelltoderate auf, als beim Wildtyp (Liu et al., 2005). Diese Befunde beruhten nicht auf Defekten in der Entwicklung von Thymozyten, sondern vermutlich eher auf einer erhöhten Sterblichkeit doppelt positiver Zellen im Thymus (Liu et al., 2005). Physiologischerweise haben doppelt positive CD4⁺CD8⁺-T-Zellen nur eine kurze Lebensspanne und treten in der Peripherie nur sporadisch auf (Nascimbeni et al., 2004). Sie sind entscheidend für die Ausreifung von T-Zellen im Thymus, indem sie durch die Bindung an MHCI- und MHCII-Komplexe die positive Selektion initiieren (Nascimbeni et al., 2004). Eine vermehrte Todesrate doppelt positiver T-Zellen, die auf einem Knockout von ILK basiert, kann also Folgen für die Ausreifung von T-Zellen haben. Die in den PBL der an ERU erkrankter Pferde detektierte Expressionssteigerung von ILK könnte möglicherweise ebenfalls auf die

T-Zellentwicklung im Thymus Einfluss nehmen. In diesem Organ wird die zentrale Toleranz induziert, die für die Eliminierung der in der ERU vermehrt auftretenden autoreaktiven T-Zellen entscheidend ist. Im Rahmen weiterer Untersuchungen zur Auswirkung einer verstärkten ILK-Expression, könnten durchflusszytometrische Analysen von equinen PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde Aufschluss darüber geben, ob eine veränderte Proteinabundanz Einfluss auf die CD4⁺-, CD8⁺- und CD4⁺CD8⁺-T-Zellpopulationen beider Phänotypen nimmt.

Zusammenfassend wurden in dieser Studie neue Informationen über die Funktionsunterschiede von Septin 7 und DOCK8 im Rahmen der equinen rezidivierenden Uveitis, einem überaus geeigneten Modell für die humane autoimmune Uveitis, gewonnen. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals entdeckte Protein-Protein-Interaktion zwischen beiden Kandidatenproteinen erbrachte neue Erkenntnisse über Pathogenese-assoziierte Mechanismen, die mit einer abweichenden Immunantwort und strukturellen Änderungen des Aktin-Zytoskeletts einhergehen. Durch die Identifikation interagierender Signaltransduktionsmoleküle in den PBL gesunder und an ERU erkrankter Pferde wurden Abweichungen bei beiden Phänotypen detektiert, die auf funktionelle Unterschiede von Septin 7 und DOCK8 bei der Erkrankung hindeuten. Die erstmals durchgeführte differentielle Expressionsanalyse von DOCK8 sowie den interagierenden Signaltransduktionsmolekülen in equinen PBL ermöglichte die Identifikation weiterer Proteine mit abweichender Abundanz, die die bisherigen Erkenntnisse zur Expressionsminderung von Septin 7 erweiterten. Die Expressionsminderung von DOCK8 sowie die Expressionssteigerung von pSTAT1 und ILK könnten damit Auswirkungen auf zahlreiche zelluläre Prozesse wie Zellmigration, Signalübertragung und Immunantwort nehmen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zur Aufklärung der ERU bei und geben darüber hinaus wertvolle Informationen über die Funktionen von DOCK8 und Septin 7, die für die immunologische Forschung bedeutsam sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine hochprävalente, wiederkehrende Augenentzündung des Pferdes, die unbehandelt mit dem vollständigen Visusverlust des betroffenen Auges einhergeht. Im Verlauf der Erkrankung infiltrieren autoreaktive T-Lymphozyten das Auge und führen dort zur Zerstörung der Retina. Durch ihre Symptomatik und ihren spontanen Charakter stellt die ERU ein überaus geeignetes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen dar.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde in den Lymphozyten an ERU erkrankter Pferde eine Expressionsminderung von Septin 7 festgestellt, die ursächlich für eine vermehrte Zellmigration in das Auge sein könnte. Darauf basierend war es nun Ziel dieser Arbeit, die Funktion von Septin 7 über sein Interaktom näher zu charakterisieren und die Rolle der interagierenden Proteine zu analysieren.

Unter den 73 potentiellen Interaktorproteinen von Septin 7 befanden sich zahlreiche, noch nie als Septin 7-Interaktoren beschriebene Kandidatenproteine. Die neu detektierten Protein-Protein-Interaktionen mit den strukturgebenden und signalübertragenden Proteinen HCLS1 und DOCK8, ermöglichten die nähere funktionelle Charakterisierung von Septin 7. Sowohl HCLS1, als auch DOCK8 nehmen eine Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und zahlreichen Prozessen im Immunsystem ein. Demnach könnte die von uns detektierte gesteigerte Expression von HCLS1 in den PBL an ERU erkrankter Pferde im Verlauf der Erkrankung zur vermehrten Migration von Immunzellen in das Auge beitragen. DOCK8 wurde hingegen mit verminderter Abundanz bei PBL an ERU erkrankter Pferde nachgewiesen. Diese Expressionsänderung könnte ebenfalls Folgen für die Zellmigration haben und zudem die Zellplastizität und die Immunantwort in an ERU erkrankten Pferden beeinflussen. Die funktionelle Rolle dieser Septin 7-Interaktoren soll zukünftig aufgrund ihrer möglichen Auswirkungen auf Zellmigration, Immunantwort und zelluläre Signalübertragung näher analysiert werden.

Funktionsunterschiede von Septin 7 und DOCK8 bei gesunden und an ERU erkrankten Pferden wurden in dieser Arbeit durch die Identifikation von interagierenden Signaltransduktionsmolekülen untersucht. Signaltransduktionsmoleküle sind für zelluläre Prozesse essentiell, da sie Signale intra- und interzellulär

weiterleiten und über die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren unterschiedliche biologische Pfade initiieren. In den PBL an ERU erkrankter Pferde wurden einige abweichende Interaktionspartner von sowohl Septin 7 als auch DOCK8 wie CDc42 und Ras Guanyl realeasing Protein 2 identifiziert. Diese Abweichungen lassen darauf schließen, dass die Beeinflussung von Signalübertragungswegen durch beide Proteine bei der Erkrankung unterschiedlich abläuft.

Aufgrund ihrer in anderen Modellen beschriebenen Immunfunktionen und zur Verfügung stehender Antikörper wählten wir zunächst die mit Septin 7 und DOCK8 interagierenden Signaltransduktionsmoleküle STAT1 und ILK für eine nähere Charakterisierung in den Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Interessanterweise wurde in den PBL erkrankter Pferde eine vermehrte Phosphorylierung (Tyr701) von STAT1 festgestellt. Dies weist eine posttranslationale Modifikation nach, die zu einer Aktivierung von STAT1 in den PBL erkrankter Pferde und damit zu einer abweichenden Th-Immunantwort führen könnte. ILK wurde in den PBL an ERU erkrankter Pferde signifikant stärker abundant nachgewiesen. Diese Expressionsänderung könnte eine abweichende zelluläre Signalübertragung und Immunantwort, sowie strukturelle Änderungen des Aktin-Zytoskeletts in den Immunzellen erkrankter Pferde nach sich ziehen, was zukünftig weiter untersucht werden soll.

Die in dieser Studie erhobenen Befunde über die Protein-Protein-Interaktionen und Expressionsänderungen von Proteinen mit interessanten Immunfunktionen erbrachten neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen im Rahmen einer spontan auftretenden Autoimmunerkrankung und bilden Grundlagen für weitere funktionelle Analysen.

7 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU), an autoimmune disease affecting horses world-wide, is associated with remitting painful attacks of the inner eye, eventually leading to blindness. During uveitic attacks, activated peripheral-blood derived T-lymphocytes infiltrate the eye by crossing the blood-retinal barrier and destruct their main target, the retina. ERU represents a valuable model for autoimmune uveitis in man, since both spontaneously developing diseases share many clinical and pathologic features. We previously identified decreased Septin 7 expression in PBL of ERU horses, pointing to changes in migration ability of these cells. Since the impact of Septin 7 expression changes on horse lymphocytes is yet to be unraveled, the aim of this study was to further characterize Septin 7 by identifying interacting proteins.

Amongst the 73 identified interactors we detected many novel proteins which have not been described as Septin 7 interactors before. Especially the newly detected protein-protein-interactions with HCLS1 and DOCK8 revealed further insights into the functional role of Septin 7. HCLS1 as well as DOCK8 showed to be involved in regulation of the cytoskeleton and many other immunological processes. Consequently, the increase of HCLS1 expression in ERU might lead to enhanced migratory ability of infiltrating lymphocytes. DOCK8 expression, however, was diminished in PBL of ERU horses which might have an impact on cell migration, lymphocyte shape and immune response.

Possible differences in Septin 7 and DOCK8 function in ERU pathogenesis were unraveled by investigating protein-protein-interactions of these proteins with signal transduction molecules in PBL of healthy controls and ERU cases. These signaling molecules are essential for the transmission of intra- and intercellular signals and for activation of certain transcription factors, initiating different biological pathways.

Compared to controls, we identified different interaction partners from the Interactome of Septin 7 and DOCK8 in ERU, such as CDc42 and Ras Guanyl releasing protein 2, indicating a deviant influence of both proteins on signaling pathways in disease.

Due to their roles in immune system previously described in other animal models and the commercial availability of antibodies, we chose two Septin 7- and DOCK8-interactors, STAT1 and ILK, for further characterization in PBL of healthy controls

and ERU cases. Interestingly, we detected an increase in STAT1 phosphorylation (Tyr 701) in ERU, indicating a posttranslational modification leading to activation of STAT1 which might have an impact on a deviant Th-immune response in ERU. ILK was confirmed to be higher abundant in ERU PBL. Due to its role in signal transduction, immune response and regulation of the actin-cytoskeleton, this elevated expression and its possible impact on ERU pathogenesis merits further investigations.

In this study we attained novel knowledge about protein-protein-interactions and protein expression changes in ERU, providing new insights in molecular mechanisms, possibly affecting the pathology of this spontaneously occurring autoimmune disease. These findings set a valuable basis for further functional in-depth analyses.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBEY, M., HAKIM, C., ANAND, R., LAFERA, J., SCHAMBACH, A., KISPERS, A., TAFT, M. H., KAEVER, V., KOTLYAROV, A., GAESTEL, M. & MENON, M. B. 2016. GTPase domain driven dimerization of SEPT7 is dispensable for the critical role of septins in fibroblast cytokinesis. *Sci Rep*, 6, 20007.
- ADNAN, E., MATSUMOTO, T., ISHIZAKI, J., ONISHI, S., SUEMORI, K., YASUKAWA, M. & HASEGAWA, H. 2016. Human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor are optimal for functional regulatory T cell induction - A comparative study. *Clin Immunol*, 173, 96-108.
- AFKARIAN, M., SEDY, J. R., YANG, J., JACOBSON, N. G., CEREB, N., YANG, S. Y., MURPHY, T. L. & MURPHY, K. M. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*, 3, 549-57.
- AGARWAL, R. K., SILVER, P. B. & CASPI, R. R. 2012. Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods Mol Biol*, 900, 443-69.
- AHMED, A. U., SARVESTANI, S. T., GANTIER, M. P., WILLIAMS, B. R. & HANNIGAN, G. E. 2014. Integrin-linked kinase modulates lipopolysaccharide- and Helicobacter pylori-induced nuclear factor kappaB-activated tumor necrosis factor-alpha production via regulation of p65 serine 536 phosphorylation. *J Biol Chem*, 289, 27776-93.
- ALVARENGA-FILHO, H., SALLES, M., HYGINO, J., FERREIRA, T. B., SACRAMENTO, P. M., MONTEIRO, C., VASCONCELOS, C. C., ALVARENGA, R. M. & BENTO, C. A. 2017. Fatigue favors in vitro Th1 and Th17-like cell expansion and reduces corticoid sensitivity in MS patients. *J Neuroimmunol*, 303, 81-89.
- ALVES DE MEDEIROS, A. K., SPEECKAERT, R., DESMET, E., VAN GELE, M., DE SCHEPPER, S. & LAMBERT, J. 2016. JAK3 as an Emerging Target for Topical Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *PLoS One*, 11, e0164080.
- ANTROBUS, R. & BORNER, G. H. 2011. Improved elution conditions for native co-immunoprecipitation. *PLoS One*, 6, e18218.
- ASLAM, B., BASIT, M., NISAR, M. A., KHURSHID, M. & RASOOL, M. H. 2017. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*, 55, 182-196.
- BENVENUTI, F., LAGAUDRIERE-GESBERT, C., GRANDJEAN, I., JANCIC, C., HIVROZ, C., TRAUTMANN, A., LANTZ, O. & AMIGORENA, S. 2004. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol*, 172, 292-301.

- BLOCH-MICHEL, E. & NUSSENBLATT, R. B. 1987. International Uveitis Study Group recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease. *Am J Ophthalmol*, 103, 234-5.
- BOLDISON, J., KHERA, T. K., COPLAND, D. A., STIMPSON, M. L., CRAWFORD, G. L., DICK, A. D. & NICHOLSON, L. B. 2015. A novel pathogenic RBP-3 peptide reveals epitope spreading in persistent experimental autoimmune uveoretinitis. *Immunology*, 146, 301-11.
- BOTBOL, Y., PATEL, B. & MACIAN, F. 2015. Common gamma-chain cytokine signaling is required for macroautophagy induction during CD4+ T-cell activation. *Autophagy*, 11, 1864-77.
- BOUTET, M., GAUTHIER, L., LECLERC, M., GROS, G., DE MONTPREVILLE, V., THERET, N., DONNADIEU, E. & MAMI-CHOUAIB, F. 2016. TGFbeta Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer Res*, 76, 1757-69.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRANDTZAEG, O. K., JOHNSEN, E., ROBERG-LARSEN, H., SEIP, K. F., MACLEAN, E. L., GESQUIERE, L. R., LEKNES, S., LUNDANES, E. & WILSON, S. R. 2016. Proteomics tools reveal startlingly high amounts of oxytocin in plasma and serum. *Sci Rep*, 6, 31693.
- BREKER, M., GYMREK, M. & SCHULDINER, M. 2013. A novel single-cell screening platform reveals proteome plasticity during yeast stress responses. *J Cell Biol*, 200, 839-50.
- BRIDGEMAN, J. S., BLAYLOCK, M., HAWKINS, R. E. & GILHAM, D. E. 2010. Development of a flow cytometric co-immunoprecipitation technique for the study of multiple protein-protein interactions and its application to T-cell receptor analysis. *Cytometry A*, 77, 338-46.
- BURKHARDT, N. B. 2015. *Untersuchungen zu Septin7 und anderen differentiell regulierten Lymphozytenproteinen bei der equinen rezidivierenden Uveitis*. Dissertation, LMU München.
- CALDERWOOD, D. A., YAN, B., DE PEREDA, J. M., ALVAREZ, B. G., FUJIOKA, Y., LIDDINGTON, R. C. & GINSBERG, M. H. 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem*, 277, 21749-58.
- CALERO-RUBIO, C., SALUJA, A. & ROBERTS, C. J. 2016. Coarse-Grained Antibody Models for "Weak" Protein-Protein Interactions from Low to High Concentrations. *J Phys Chem B*, 120, 6592-605.

- CARBONE, F., DE ROSA, V., CARRIERI, P. B., MONTELLA, S., BRUZZESE, D., PORCELLINI, A., PROCACCINI, C., LA CAVA, A. & MATARESE, G. 2014. Regulatory T cell proliferative potential is impaired in human autoimmune disease. *Nat Med*, 20, 69-74.
- CARRIZOSA, E., GOMEZ, T. S., LABNO, C. M., KLOS DEHRING, D. A., LIU, X., FREEDMAN, B. D., BILLADEAU, D. D. & BURKHARDT, J. K. 2009. Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 is recruited to the immunological synapse by IL-2-inducible T cell kinase and regulates phospholipase Cgamma1 Microcluster dynamics during T cell spreading. *J Immunol*, 183, 7352-61.
- CASEY, T. M., KHAN, J. M., BRINGANS, S. D., KOUDELKA, T., TAKLE, P. S., DOWNS, R. A., LIVK, A., SYME, R. A., TAN, K. C. & LIPSCOMBE, R. J. 2017. Analysis of Reproducibility of Proteome Coverage and Quantitation Using Isobaric Mass Tags (iTRAQ and TMT). *J Proteome Res*, 16, 384-392.
- CASPI, R. R. 2003. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15, Unit 15 6.
- CASPI, R. R. 2006. Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev*, 213, 23-35.
- CASPI, R. R. 2010. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest*, 120, 3073-83.
- CASPI, R. R. 2014. Understanding autoimmunity in the eye: from animal models to novel therapies. *Discov Med*, 17, 155-62.
- CASPI, R. R., ROBERGE, F. G., CHAN, C. C., WIGGERT, B., CHADER, G. J., ROZENSZAJN, L. A., LANDO, Z. & NUSSENBLATT, R. B. 1988. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol*, 140, 1490-5.
- CHAN, C. C., NUSSENBLATT, R. B., WIGGERT, B., REDMOND, T. M., FUJIKAWA, L. S., CHADER, G. J. & GERY, I. 1987. Immunohistochemical analysis of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in the rat. *Immunol Invest*, 16, 63-74.
- CHEN, E. J., BIN ISMAIL, M. A., MI, H., HO, S. L., LIM, W. K., TEOH, S. C. & AGRAWAL, R. 2016. Ocular Autoimmune Systemic Inflammatory Infectious Study (OASIS) - Report 1: Epidemiology and Classification. *Ocul Immunol Inflamm*, 1-15.
- CHEN, J., QIAN, H., HORAI, R., CHAN, C. C., FALICK, Y. & CASPI, R. R. 2013. Comparative analysis of induced vs. spontaneous models of autoimmune uveitis targeting the interphotoreceptor retinoid binding protein. *PLoS One*, 8, e72161.
- CHODISETTI, S. B., RAI, P. K., GOWTHAMAN, U., PAHARI, S. & AGREWALA, J. N. 2012. Potential T cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis that can instigate molecular mimicry against host: implications in autoimmune pathogenesis. *BMC Immunol*, 13, 13.

- COBURN, P. S., WISKUR, B. J., MILLER, F. C., LAGROW, A. L., ASTLEY, R. A., ELLIOTT, M. H. & CALLEGAN, M. C. 2016. Bloodstream-To-Eye Infections Are Facilitated by Outer Blood-Retinal Barrier Dysfunction. *PLoS One*, 11, e0154560.
- COOPER, G. S., BYNUM, M. L. & SOMERS, E. C. 2009. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun*, 33, 197-207.
- COUGHLIN, B., SCHNABOLK, G., JOSEPH, K., RAIKWAR, H., KUNCHITHAPAUTHAM, K., JOHNSON, K., MOORE, K., WANG, Y. & ROHRER, B. 2016. Connecting the innate and adaptive immune responses in mouse choroidal neovascularization via the anaphylatoxin C5a and gammadeltaT-cells. *Sci Rep*, 6, 23794.
- COUTAZ, M., HURRELL, B. P., AUDERSET, F., WANG, H., SIEGERT, S., EBERL, G., HO, P. C., RADTKE, F. & TACCHINI-COTTIER, F. 2016. Notch regulates Th17 differentiation and controls trafficking of IL-17 and metabolic regulators within Th17 cells in a context-dependent manner. *Sci Rep*, 6, 39117.
- CRUZ, L. O., HASHEMIFAR, S. S., WU, C. J., CHO, S., NGUYEN, D. T., LIN, L. L., KHAN, A. A. & LU, L. F. 2017. Excessive expression of miR-27 impairs Treg-mediated immunological tolerance. *J Clin Invest*.
- CUNNINGHAM, A. D., QVIT, N. & MOCHLY-ROSEN, D. 2017. Peptides and peptidomimetics as regulators of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*, 44, 59-66.
- DARIDON, C., PERS, J. O., DEVAUCHELLE, V., MARTINS-CARVALHO, C., HUTIN, P., PENNEC, Y. L., SARAUX, A. & YOUINOU, P. 2006. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 54, 2280-8.
- DEEG, C. A. 2008. Ocular immunology in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*, 11 Suppl 1, 61-5.
- DEEG, C. A., AMANN, B., RAITH, A. J. & KASPERS, B. 2006a. Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 652-6.
- DEEG, C. A., EHRENHOFER, M., THURAU, S. R., REESE, S., WILDNER, G. & KASPERS, B. 2002a. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res*, 75, 127-33.
- DEEG, C. A., HAUCK, S. M., AMANN, B., POMPETZKI, D., ALTMANN, F., RAITH, A., SCHMALZL, T., STANGASSINGER, M. & UEFFING, M. 2008. Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res*, 40, 151-3.
- DEEG, C. A., KASPERS, B., GERHARDS, H., THURAU, S. R., WOLLANKE, B. & WILDNER, G. 2001. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 393-8.

- DEEG, C. A., MARTI, E., GAILLARD, C. & KASPERS, B. 2004a. Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9. *Equine Vet J*, 36, 73-5.
- DEEG, C. A., POMPETZKI, D., RAITH, A. J., HAUCK, S. M., AMANN, B., SUPPMANN, S., GOEBEL, T. W., OLAZABAL, U., GERHARDS, H., REESE, S., STANGASSINGER, M., KASPERS, B. & UEFFING, M. 2006b. Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics*, 5, 1462-70.
- DEEG, C. A., RAITH, A. J., AMANN, B., CRABB, J. W., THURAU, S. R., HAUCK, S. M., UEFFING, M., WILDNER, G. & STANGASSINGER, M. 2007. CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol*, 2007, 39245.
- DEEG, C. A., REESE, S., GERHARDS, H., WILDNER, G. & KASPERS, B. 2004b. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 2286-92.
- DEEG, C. A., THURAU, S. R., GERHARDS, H., EHRENHOFER, M., WILDNER, G. & KASPERS, B. 2002b. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol*, 32, 2598-606.
- DEGROOTE, R. L., HAUCK, S. M., AMANN, B., HIRMER, S., UEFFING, M. & DEEG, C. A. 2014. Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis. *PLoS One*, 9, e91684.
- DEGROOTE, R. L., HAUCK, S. M., KREMMER, E., AMANN, B., UEFFING, M. & DEEG, C. A. 2012. Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics*, 75, 4536-44.
- DEGROOTE, R. L., HAUCK, S. M., TREUTLEIN, G., AMANN, B., FROHLICH, K. J., KREMMER, E., MERL, J., STANGASSINGER, M., UEFFING, M. & DEEG, C. A. 2013. Expression changes and novel interaction partners of talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis. *J Proteome Res*, 12, 5812-9.
- DEGROOTE, R. L., UHL, P. B., AMANN, B., KRACKHARDT, A. M., UEFFING, M., HAUCK, S. M. & DEEG, C. A. 2017. Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics*, 154, 102-108.
- DEHRING, D. A., CLARKE, F., RICART, B. G., HUANG, Y., GOMEZ, T. S., WILLIAMSON, E. K., HAMMER, D. A., BILLADEAU, D. D., ARGON, Y. & BURKHARDT, J. K. 2011. Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 functions in concert with the Wiskott-Aldrich syndrome protein to promote podosome array organization and chemotaxis in dendritic cells. *J Immunol*, 186, 4805-18.

- DEWISPELAERE, R., LIPSKI, D., FOUCART, V., BRUYNS, C., FRERE, A., CASPERS, L. & WILLERMAIN, F. 2015. ICAM-1 and VCAM-1 are differentially expressed on blood-retinal barrier cells during experimental autoimmune uveitis. *Exp Eye Res*, 137, 94-102.
- DIVERS, T. J., IRBY, N. L., MOHAMMED, H. O. & SCHWARK, W. S. 2008. Ocular penetration of intravenously administered enrofloxacin in the horse. *Equine Vet J*, 40, 167-70.
- DIWO, E., GUEUDRY, J., SAADOUN, D., WESCHLER, B., LEHOANG, P. & BODAGHI, B. 2016. Long-term Efficacy of Interferon in Severe Uveitis Associated with Behcet Disease. *Ocul Immunol Inflamm*, 1-9.
- EISENFELD, A. J., BUNT-MILAM, A. H. & SAARI, J. C. 1987. Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Exp Eye Res*, 44, 425-38.
- EMMI, G., SILVESTRI, E., BELLA, C. D., GRASSI, A., BENAGIANO, M., CIANCHI, F., SQUATRITO, D., CANTARINI, L., EMMI, L., SELMI, C., PRISCO, D. & D'ELIOS, M. M. 2016. Cytotoxic Th1 and Th17 cells infiltrate the intestinal mucosa of Behcet patients and exhibit high levels of TNF-alpha in early phases of the disease. *Medicine (Baltimore)*, 95, e5516.
- ENGELHARDT, K. R., MCGHEE, S., WINKLER, S., SASSI, A., WOELLNER, C., LOPEZ-HERRERA, G., CHEN, A., KIM, H. S., LLORET, M. G., SCHULZE, I., EHL, S., THIEL, J., PFEIFER, D., VEELKEN, H., NIEHUES, T., SIEPERMANN, K., WEINSPACH, S., REISLI, I., KELES, S., GENEL, F., KUTUKCULER, N., CAMCIOGLU, Y., SOMER, A., KARAKOC-AYDINER, E., BARLAN, I., GENNERY, A., METIN, A., DEGERLIYURT, A., PIETROGRANDE, M. C., YEGANEH, M., BAZ, Z., AL-TAMEMI, S., KLEIN, C., PUCK, J. M., HOLLAND, S. M., MCCABE, E. R., GRIMBACHER, B. & CHATILA, T. A. 2009. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 124, 1289-302 e4.
- ESKANDARPOUR, M., ALEXANDER, R., ADAMSON, P. & CALDER, V. L. 2017. Pharmacological Inhibition of Bromodomain Proteins Suppresses Retinal Inflammatory Disease and Downregulates Retinal Th17 Cells. *J Immunol*, 198, 1093-1103.
- FANG, Z., HECKLAU, K., GROSS, F., BACHMANN, I., VENZKE, M., KARL, M., SCHUCHHARDT, J., RADBRUCH, A., HERZEL, H. & BAUMGRASS, R. 2015. Transcription factor co-occupied regions in the murine genome constitute T-helper-cell subtype-specific enhancers. *Eur J Immunol*, 45, 3150-7.
- FAUNCE, D. E. & STEIN-STREILEIN, J. 2002. NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8+ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J Immunol*, 169, 31-8.

- FOX, G. M., KUWABARA, T., WIGGERT, B., REDMOND, T. M., HESS, H. H., CHADER, G. J. & GERY, I. 1987. Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): differences between EAU induced by IRBP and by S-antigen. *Clin Immunol Immunopathol*, 43, 256-64.
- FRIEDRICH, E. B., SINHA, S., LI, L., DEDHAR, S., FORCE, T., ROSENZWEIG, A. & GERSZTEN, R. E. 2002. Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J Biol Chem*, 277, 16371-5.
- FRISULLO, G., ANGELUCCI, F., CAGGIULA, M., NOCITI, V., IORIO, R., PATANELLA, A. K., SANCRICCA, C., MIRABELLA, M., TONALI, P. A. & BATOCCHI, A. P. 2006. pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. *J Neurosci Res*, 84, 1027-36.
- FRITZ, K. L., KAESE, H. J., VALBERG, S. J., HENDRICKSON, J. A., RENDAHL, A. K., BELLONE, R. R., DYNES, K. M., WAGNER, M. L., LUCIO, M. A., CUOMO, F. M., BRINKMEYER-LANGFORD, C. L., SKOW, L. C., MICKELSON, J. R., RUTHERFORD, M. S. & MCCUE, M. E. 2014. Genetic risk factors for insidious equine recurrent uveitis in Appaloosa horses. *Anim Genet*, 45, 392-9.
- FRUHAUF, B., OHNESORGE, B., DEEGEN, E. & BOEVE, M. 1998. Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy. *Vet Ophthalmol*, 1, 137-151.
- FUJIO, N., MASUOKA, S., SHIKANO, K., KUSUNOKI, N., NANKI, T. & KAWAI, S. 2016. Apparent Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Suppression via Reduction of Interleukin-6 by Glucocorticoid Therapy in Systemic Autoimmune Diseases. *PLoS One*, 11, e0167854.
- GERDING, J. C. & GILGER, B. C. 2016. Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Vet J*, 48, 290-8.
- GILGER, B. C. 2010. Equine recurrent uveitis: the viewpoint from the USA. *Equine Vet J Suppl*, 57-61.
- GILGER, B. C., MALOK, E., CUTTER, K. V., STEWART, T., HOROHOF, D. W. & ALLEN, J. B. 1999. Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 71, 17-28.
- GILGER, B. C., MALOK, E., STEWART, T., HOROHOF, D., ASHTON, P., SMITH, T., JAFFE, G. J. & ALLEN, J. B. 2000. Effect of an intravitreal cyclosporine implant on experimental uveitis in horses. *Vet Immunol Immunopathol*, 76, 239-55.
- GILGER, B. C. & MICHAU, T. M. 2004. Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20, 417-27, vii.

- GILGER, B. C., SALMON, J. H., YI, N. Y., BARDEN, C. A., CHANDLER, H. L., WENDT, J. A. & COLITZ, C. M. 2008. Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States. *Am J Vet Res*, 69, 1329-35.
- GILGER, B. C., WILKIE, D. A., CLODE, A. B., MCMULLEN, R. J., JR., UTTER, M. E., KOMAROMY, A. M., BROOKS, D. E. & SALMON, J. H. 2010. Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*, 13, 294-300.
- GILMOUR, M. A., CLARKE, C. R., MACALLISTER, C. G., DEDEO, J. M., CAUDELL, D. L., MORTON, R. J. & PUGH, M. 2005. Ocular penetration of oral doxycycline in the horse. *Vet Ophthalmol*, 8, 331-5.
- GOMEZ-VALADES, A. G., LLAMAS, M., BLANCH, S., PERALES, J. C., ROMAN, J., GOMEZ-CASAJUS, L. & MASCARO, C. 2012. Specific Jak3 Downregulation in Lymphocytes Impairs gammac Cytokine Signal Transduction and Alleviates Antigen-driven Inflammation In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids*, 1, e42.
- GOMEZ, T. S., MCCARNEY, S. D., CARRIZOSA, E., LABNO, C. M., COMISKEY, E. O., NOLZ, J. C., ZHU, P., FREEDMAN, B. D., CLARK, M. R., RAWLINGS, D. J., BILLADEAU, D. D. & BURKHARDT, J. K. 2006. HS1 functions as an essential actin-regulatory adaptor protein at the immune synapse. *Immunity*, 24, 741-52.
- GORENEC, L., ZIDOVEC LEPEJ, S., GRGIC, I., PLANINIC, A., ISCIC BES, J., VINCE, A. & BEGOVAC, J. 2016. The comparison of Th1, Th2, Th9, Th17 and Th22 cytokine profiles in acute and chronic HIV-1 infection. *Microb Pathog*, 97, 125-30.
- GRIESEMER, A. D., SORENSON, E. C. & HARDY, M. A. 2010. The role of the thymus in tolerance. *Transplantation*, 90, 465-74.
- GRITZ, D. C., SCHWABER, E. J. & WONG, I. G. 2017. Complications of Uveitis: The Northern California Epidemiology of Uveitis Study. *Ocul Immunol Inflamm*, 1-11.
- GROSCHKE, A., HAUSER, A., LEPPER, M. F., MAYO, R., VON TOERNE, C., MERL-PHAM, J. & HAUCK, S. M. 2016. The Proteome of Native Adult Muller Glial Cells From Murine Retina. *Mol Cell Proteomics*, 15, 462-80.
- HAAN, C., ROLVERING, C., RAULF, F., KAPP, M., DRUCKES, P., THOMA, G., BEHRMANN, I. & ZERWES, H. G. 2011. Jak1 has a dominant role over Jak3 in signal transduction through gammac-containing cytokine receptors. *Chem Biol*, 18, 314-23.
- HAM, H., GUERRIER, S., KIM, J., SCHOON, R. A., ANDERSON, E. L., HAMANN, M. J., LOU, Z. & BILLADEAU, D. D. 2013. Deducator of cytokinesis 8 interacts with talin and Wiskott-Aldrich syndrome protein to regulate NK cell cytotoxicity. *J Immunol*, 190, 3661-9.

- HANNIGAN, G. E., LEUNG-HAGESTEIJN, C., FITZ-GIBBON, L., COPPOLINO, M. G., RADEVA, G., FILMUS, J., BELL, J. C. & DEDHAR, S. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*, 379, 91-6.
- HARADA, Y., TANAKA, Y., TERASAWA, M., PIECZYK, M., HABIRO, K., KATAKAI, T., HANAWA-SUETSUGU, K., KUKIMOTO-NIINO, M., NISHIZAKI, T., SHIROUZU, M., DUAN, X. F., URUNO, T., NISHIKIMI, A., SANEMATSU, F., YOKOYAMA, S., STEIN, J. V., KINASHI, T. & FUKUI, Y. 2012. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood*, 119, 4451-4461.
- HAUCK, S. M., DIETTER, J., KRAMER, R. L., HOFMAIER, F., ZIPPLIES, J. K., AMANN, B., FEUCHTINGER, A., DEEG, C. A. & UEFFING, M. 2010. Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 9, 2292-305.
- HAUCK, S. M., SCHOEFFMANN, S., AMANN, B., STANGASSINGER, M., GERHARDS, H., UEFFING, M. & DEEG, C. A. 2007. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res*, 6, 2121-31.
- HAYAKAWA, T., TEYE, K., HACHIYA, T., UEHARA, R., HASHIGUCHI, M., KAWAKAMI, T., LI, X., TSUCHISAKA, A., OHARA, K., SOGAME, R., KOGA, H., HAMADA, T., OHATA, C., FURUMURA, M., ISHII, N., FUKANO, H., SHIMOZATO, K. & HASHIMOTO, T. 2016. Clinical and immunological profiles of anti-BP230-type bullous pemphigoid: Restriction of epitopes to the C-terminal domain of BP230, shown by novel ELISAs of BP230-domain specific recombinant proteins. *Eur J Dermatol*, 26, 155-63.
- HENDERSON, L. A., ZURAKOWSKI, D., ANGELES-HAN, S. T., LASKY, A., RABINOVICH, C. E., LO, M. S., CHILDHOOD, A. & RHEUMATOLOGY RESEARCH ALLIANCE REGISTRY, I. 2016. Medication use in juvenile uveitis patients enrolled in the Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance Registry. *Pediatr Rheumatol Online J*, 14, 9.
- HERBIN, O., BONITO, A. J., JEONG, S., WEINSTEIN, E. G., RAHMAN, A. H., XIONG, H., MERAD, M. & ALEXANDROPOULOS, K. 2016. Medullary thymic epithelial cells and CD8alpha+ dendritic cells coordinately regulate central tolerance but CD8alpha+ cells are dispensable for thymic regulatory T cell production. *J Autoimmun*, 75, 141-149.
- HIRAI, T., ISHII, R., MIYAIRI, S., IKEMIYAGI, M., OMOTO, K., ISHII, Y. & TANABE, K. 2016. Clonal Deletion Established via Invariant NKT Cell Activation and Costimulatory Blockade Requires In Vivo Expansion of Regulatory T Cells. *Am J Transplant*, 16, 426-39.
- HIROSE, S., KUWABARA, T., NUSSENBLATT, R. B., WIGGERT, B., REDMOND, T. M. & GERY, I. 1986. Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Arch Ophthalmol*, 104, 1698-702.

- HONDA, S., SHIROTANI-IKEJIMA, H., TADOKORO, S., TOMIYAMA, Y. & MIYATA, T. 2013. The integrin-linked kinase-PINCH-parvin complex supports integrin α IIb β 3 activation. *PLoS One*, 8, e5498.
- HORAI, R., SILVER, P. B., CHEN, J., AGARWAL, R. K., CHONG, W. P., JITTAYASOTHORN, Y., MATTAPALLIL, M. J., NGUYEN, S., NATARAJAN, K., VILLASMIL, R., WANG, P., KARABEKIAN, Z., LYTTON, S. D., CHAN, C. C. & CASPI, R. R. 2013. Breakdown of immune privilege and spontaneous autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen. *J Autoimmun*, 44, 21-33.
- HOSP, F., VOSSFELDT, H., HEINIG, M., VASILJEVIC, D., ARUMUGHAN, A., WYLER, E., GENETIC, ENVIRONMENTAL RISK FOR ALZHEIMER'S DISEASE, G. C., LANDTHALER, M., HUBNER, N., WANKER, E. E., LANNFELT, L., INGELSSON, M., LALOWSKI, M., VOIGT, A. & SELBACH, M. 2015. Quantitative interaction proteomics of neurodegenerative disease proteins. *Cell Rep*, 11, 1134-46.
- HOU, M., LIU, X., CAO, J. & CHEN, B. 2016. SEPT7 overexpression inhibits glioma cell migration by targeting the actin cytoskeleton pathway. *Oncol Rep*, 35, 2003-10.
- HSU, W. L., OLDFIELD, C. J., XUE, B., MENG, J., HUANG, F., ROMERO, P., UVERSKY, V. N. & DUNKER, A. K. 2013. Exploring the binding diversity of intrinsically disordered proteins involved in one-to-many binding. *Protein Sci*, 22, 258-73.
- HUGUES, S., FETLER, L., BONIFAZ, L., HELFT, J., AMBLARD, F. & AMIGORENA, S. 2004. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol*, 5, 1235-42.
- HURTADO-GUERRERO, I., PINTO-MEDEL, M. J., URBANEJA, P., RODRIGUEZ-BADA, J. L., LEON, A., GUERRERO, M., FERNANDEZ, O., LEYVA, L. & OLIVER-MARTOS, B. 2017. Activation of the JAK-STAT Signaling Pathway after In Vitro Stimulation with IFN α s in Multiple Sclerosis Patients According to the Therapeutic Response to IFN α s. *PLoS One*, 12, e0170031.
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*, 16, 343-53.
- JABARA, H. H., MCDONALD, D. R., JANSSEN, E., MASSAAD, M. J., RAMESH, N., BORZUTZKY, A., RAUTER, I., BENSON, H., SCHNEIDER, L., BAXI, S., RECHER, M., NOTARANGELO, L. D., WAKIM, R., DBAIBO, G., DASOUKI, M., AL-HERZ, W., BARLAN, I., BARIS, S., KUTUKCULER, N., OCHS, H. D., PLEBANI, A., KANARIOU, M., LEFRANC, G., REISLI, I., FITZGERALD, K. A., GOLENBOCK, D., MANIS, J., KELES, S., CEJA, R., CHATILA, T. A. & GEHA, R. S. 2012. DOCK8 functions as an adaptor that links TLR-MyD88 signaling to B cell activation. *Nat Immunol*, 13, 612-20.

- JANSSEN, E., TOHME, M., HEDAYAT, M., LEICK, M., KUMARI, S., RAMESH, N., MASSAAD, M. J., ULLAS, S., AZCUTIA, V., GOODNOW, C. C., RANDALL, K. L., QIAO, Q., WU, H., AL-HERZ, W., COX, D., HARTWIG, J., IRVINE, D. J., LUSCINSKAS, F. W. & GEHA, R. S. 2016. A DOCK8-WIP-WASp complex links T cell receptors to the actin cytoskeleton. *J Clin Invest*, 126, 3837-3851.
- JIA, Z. F., HUANG, Q., KANG, C. S., YANG, W. D., WANG, G. X., YU, S. Z., JIANG, H. & PU, P. Y. 2010. Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth. *J Neurooncol*, 98, 329-40.
- JIANG, G., WANG, Y., YUN, J., HAJRASOULIHA, A. R., ZHAO, Y., SUN, D., KAPLAN, H. J. & SHAO, H. 2015. HMGB1 release triggered by the interaction of live retinal cells and uveitogenic T cells is Fas/FasL activation-dependent. *J Neuroinflammation*, 12, 179.
- JIANG, Z., SHEN, H., TANG, B., CHEN, H., YU, Q., JI, X. & WANG, L. 2017. Identification of diagnostic markers involved in the pathogenesis of gastric cancer through iTRAQ-based quantitative proteomics. *Data Brief*, 11, 122-126.
- JIN, S., SHIN, J. U., NOH, J. Y., KIM, H., KIM, J. Y., KIM, S. H., KIM, J. H., PARK, C. O., LEE, N., LEE, H., LEE, J. S. & LEE, K. H. 2016. DOCK8: regulator of Treg in response to corticotropin-releasing hormone. *Allergy*, 71, 811-9.
- JING, H., ZHANG, Q., ZHANG, Y., HILL, B. J., DOVE, C. G., GELFAND, E. W., ATKINSON, T. P., UZEL, G., MATTHEWS, H. F., MUSTILLO, P. J., LEWIS, D. B., KAVADAS, F. D., HANSON, I. C., KUMAR, A. R., GEHA, R. S., DOUEK, D. C., HOLLAND, S. M., FREEMAN, A. F. & SU, H. C. 2014. Somatic reversion in dedicator of cytokinesis 8 immunodeficiency modulates disease phenotype. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 1667-75.
- JOBERTY, G., PERLUNGHER, R. R., SHEFFIELD, P. J., KINOSHITA, M., NODA, M., HAYSTEAD, T. & MACARA, I. G. 2001. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat Cell Biol*, 3, 861-6.
- JOUVE, L., BENRABAH, R., HERON, E., BODAGHI, B., HOANG, P. L. & TOUITOU, V. 2016. Multiple Sclerosis-related Uveitis: Does MS Treatment Affect Uveitis Course? *Ocul Immunol Inflamm*, 1-6.
- KANHERE, A., HERTWECK, A., BHATIA, U., GOKMEN, M. R., PERUCHA, E., JACKSON, I., LORD, G. M. & JENNER, R. G. 2012. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun*, 3, 1268.
- KE, Y., LIU, K., HUANG, G. Q., CUI, Y., KAPLAN, H. J., SHAO, H. & SUN, D. 2009. Anti-inflammatory role of IL-17 in experimental autoimmune uveitis. *J Immunol*, 182, 3183-90.

- KELES, S., CHARBONNIER, L. M., KABALEESWARAN, V., REISLI, I., GENEL, F., GULEZ, N., AL-HERZ, W., RAMESH, N., PEREZ-ATAYDE, A., KARACA, N. E., KUTUKCULER, N., WU, H., GEHA, R. S. & CHATILA, T. A. 2016. Dedicator of cytokinesis 8 regulates signal transducer and activator of transcription 3 activation and promotes TH17 cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 1384-1394 e2.
- KIENZLER, A. K., VAN SCHOUWENBURG, P. A., TAYLOR, J., MARWAH, I., SHARMA, R. U., NOAKES, C., THOMSON, K., SADLER, R., SEGAL, S., FERRY, B., TAYLOR, J. C., BLAIR, E., CHAPEL, H. & PATEL, S. Y. 2016. Hypomorphic function and somatic reversion of DOCK8 cause combined immunodeficiency without hyper-IgE. *Clin Immunol*, 163, 17-21.
- KIM, M. S., FROESE, C. D., XIE, H. & TRIMBLE, W. S. 2012. Uncovering principles that control septin-septin interactions. *J Biol Chem*, 287, 30406-13.
- KINOSHITA, A., KINOSHITA, M., AKIYAMA, H., TOMIMOTO, H., AKIGUCHI, I., KUMAR, S., NODA, M. & KIMURA, J. 1998. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 153, 1551-60.
- KINOSHITA, M., FIELD, C. M., COUGHLIN, M. L., STRAIGHT, A. F. & MITCHISON, T. J. 2002. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell*, 3, 791-802.
- KITA, A., HINO, N., HIGASHI, S., HIROTA, K., NARUMI, R., ADACHI, J., TAKAFUJI, K., ISHIMOTO, K., OKADA, Y., SAKAMOTO, K., TOMONAGA, T., TAKASHIMA, S., MIZUGUCHI, H. & DOI, T. 2016. Adenovirus vector-based incorporation of a photo-cross-linkable amino acid into proteins in human primary cells and cancerous cell lines. *Sci Rep*, 6, 36946.
- KITAMURA, D., KANEKO, H., MIYAGOE, Y., ARIYASU, T. & WATANABE, T. 1989. Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucleic Acids Res*, 17, 9367-79.
- KLEINWORT, K. J., AMANN, B., HAUCK, S. M., FEEDERLE, R., SEKUNDO, W. & DEEG, C. A. 2016. Immunological Characterization of Intraocular Lymphoid Follicles in a Spontaneous Recurrent Uveitis Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57, 4504-11.
- KOSZARNY, A., MAJDAN, M., DRYGLEWSKA, M. & TABARKIEWICZ, J. 2015. Prevalence of selected organ-specific autoantibodies in rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome patients. *Reumatologia*, 53, 61-8.
- KOUWAKI, T., FUKUSHIMA, Y., DAITO, T., SANADA, T., YAMAMOTO, N., MIFSUD, E. J., LEONG, C. R., TSUKIYAMA-KOHARA, K., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., SEYA, T. & OSHIUMI, H. 2016. Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection. *Front Immunol*, 7, 335.

- KULBROCK, M., LEHNER, S., METZGER, J., OHNESORGE, B. & DISTL, O. 2013. A genome-wide association study identifies risk loci to equine recurrent uveitis in German warmblood horses. *PLoS One*, 8, e71619.
- KUULIALA, K., KUULIALA, A., KOIVUNIEMI, R., KAUTIAINEN, H., REPO, H. & LEIRISALO-REPO, M. 2016. STAT6 and STAT1 Pathway Activation in Circulating Lymphocytes and Monocytes as Predictor of Treatment Response in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*, 11, e0167975.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAMBE, T., CRAWFORD, G., JOHNSON, A. L., CROCKFORD, T. L., BOURIEZ-JONES, T., SMYTH, A. M., PHAM, T. H., ZHANG, Q., FREEMAN, A. F., CYSTER, J. G., SU, H. C. & CORNALL, R. J. 2011. DOCK8 is essential for T-cell survival and the maintenance of CD8+ T-cell memory. *Eur J Immunol*, 41, 3423-35.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, Y., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, A. T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- LANGE, A., WICKSTROM, S. A., JAKOBSON, M., ZENT, R., SAINIO, K. & FASSLER, R. 2009. Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature*, 461, 1002-6.
- LEE, H. W., KYUNG, T., YOO, J., KIM, T., CHUNG, C., RYU, J. Y., LEE, H., PARK, K., LEE, S., JONES, W. D., LIM, D. S., HYEON, C., HEO, W. D. & YOON, T. Y. 2013. Real-time single-molecule co-immunoprecipitation analyses reveal cancer-specific Ras signalling dynamics. *Nat Commun*, 4, 1505.

- LI, X., WAN, T., ZHANG, S., LI, D. & HAN, X. 2016. Quantitative proteomic analysis and comparison of two bone marrow stromal cell lines using the SILAC method. *Exp Hematol*, 44, 1059-1071.
- LIANG, D., NIAN, H., SHAO, H., KAPLAN, H. J. & SUN, D. 2017a. Functional Conversion and Dominance of gammadelta T Subset in Mouse Experimental Autoimmune Uveitis. *J Immunol*.
- LIANG, Y., TSOI, L. C., XING, X., BEAMER, M. A., SWINDELL, W. R., SARKAR, M. K., BERTHIER, C. C., STUART, P. E., HARMS, P. W., NAIR, R. P., ELDER, J. T., VOORHEES, J. J., KAHLENBERG, J. M. & GUDJONSSON, J. E. 2017b. A gene network regulated by the transcription factor VGLL3 as a promoter of sex-biased autoimmune diseases. *Nat Immunol*, 18, 152-160.
- LIN, H. H., FAUNCE, D. E., STACEY, M., TERAJEWICZ, A., NAKAMURA, T., ZHANG-HOOVER, J., KERLEY, M., MUCENSKI, M. L., GORDON, S. & STEIN-STREILEIN, J. 2005. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med*, 201, 1615-25.
- LIU, E., SINHA, S., WILLIAMS, C., CYRILLE, M., HELLER, E., SNAPPER, S. B., GEORGOPOULOS, K., ST-ARNAUD, R., FORCE, T., DEDHAR, S. & GERSZTEN, R. E. 2005. Targeted deletion of integrin-linked kinase reveals a role in T-cell chemotaxis and survival. *Mol Cell Biol*, 25, 11145-55.
- LIU, F., RIJKERS, D. T., POST, H. & HECK, A. J. 2015. Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry. *Nat Methods*, 12, 1179-84.
- LIZOTTI CILIAO, H., BATISTA DE OLIVEIRA CAMARGO-GODOY, R., MAZZARON BARCELOS, G. R., ZANUTO, A., DAHER ALVARES DELFINO, V. & DE SYLLOS COLUS, I. M. 2016. Long-term genotoxic effects of immunosuppressive drugs on lymphocytes of kidney transplant recipients. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 806, 47-52.
- LOSSL, P., VAN DE WATERBEEMD, M. & HECK, A. J. 2016. The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. *EMBO J*, 35, 2634-2657.
- LU, M. Y., HUANG, C. I., DAI, C. Y., WANG, S. C., HSIEH, M. Y., HSIEH, M. H., LIANG, P. C., LIN, Y. H., HOU, N. J., YEH, M. L., HUANG, C. F., LIN, Z. Y., CHEN, S. C., HUANG, J. F., CHUANG, W. L. & YU, M. L. 2016. Elevated on-treatment levels of serum IFN-gamma is associated with treatment failure of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Sci Rep*, 6, 22995.
- LUCA, C., RAFFAELLA, A., SYLVIA, M., VALENTINA, M., FABIANA, V., MARCO, C., ANNAMARIA, S., LUISA, S., ALESSANDRO, F., LUCIA, B., ALESSANDRO, Z., MARIA, P., MATTHEW, C., ALESSANDRA, S., CARLO, S. & LUIGI, F. 2017. Changes in patterns of uveitis at a tertiary referral center in Northern Italy: analysis of 990 consecutive cases. *Int Ophthalmol*.

- LUGER, D., SILVER, P. B., TANG, J., CUA, D., CHEN, Z., IWAKURA, Y., BOWMAN, E. P., SGAMBELLONE, N. M., CHAN, C. C. & CASPI, R. R. 2008. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med*, 205, 799-810.
- LUTTERBERG, K. 2017. *Unterschiedliche Immunkapazitäten beim Rind nach polyklonaler Stimulation*. LMU München.
- MALHOTRA, D., LINEHAN, J. L., DILEEPAN, T., LEE, Y. J., PURTHA, W. E., LU, J. V., NELSON, R. W., FIFE, B. T., ORR, H. T., ANDERSON, M. S., HOGQUIST, K. A. & JENKINS, M. K. 2016. Tolerance is established in polyclonal CD4(+) T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol*, 17, 187-95.
- MANGINO, M., ROEDERER, M., BEDDALL, M. H., NESTLE, F. O. & SPECTOR, T. D. 2017. Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors. *Nat Commun*, 8, 13850.
- MARTIN, C. M., LACOMBA, M. S., MOLINA, C. I., CHAMOND, R. R., GALERA, J. M. & ESTEVEZ, E. C. 2000. Levels of soluble ICAM-1 and soluble IL-2R in the serum and aqueous humor of uveitis patients. *Curr Eye Res*, 20, 287-92.
- MASLANKA, T., ZIOLKOWSKA, N., ZIOLKOWSKI, H. & MALACZEWSKA, J. 2017. CD25+CD127+Foxp3- Cells Represent a Major Subpopulation of CD8+ T Cells in the Eye Chambers of Normal Mice. *PLoS One*, 12, e0170021.
- MATTAPALLIL, M. J., SILVER, P. B., CORTES, L. M., ST LEGER, A. J., JITTAYASOTHORN, Y., KIELCZEWSKI, J. L., MOON, J. J., CHAN, C. C. & CASPI, R. R. 2015. Characterization of a New Epitope of IRBP That Induces Moderate to Severe Uveoretinitis in Mice With H-2b Haplotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56, 5439-49.
- MEDAWAR, P. B. 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*, 29, 58-69.
- MEREDITH, M., ZEMMOUR, D., MATHIS, D. & BENOIST, C. 2015. Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nat Immunol*, 16, 942-9.
- MOCHIZUKI, M., KUWABARA, T., MCALLISTER, C., NUSSENBLATT, R. B. & GERY, I. 1985. Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26, 1-9.
- MOORE, J. R. & ADLER, F. 2016. A Mathematical Model of T1D Acceleration and Delay by Viral Infection. *Bull Math Biol*, 78, 500-30.

- MORRIS, E. J., ASSI, K., SALH, B. & DEDHAR, S. 2015. Integrin-linked kinase links dynactin-1/dynactin-2 with cortical integrin receptors to orient the mitotic spindle relative to the substratum. *Sci Rep*, 5, 8389.
- MORTENSEN, S. A., SANDER, B., JENSEN, R. K., PEDERSEN, J. S., GOLAS, M. M., JENSENIUS, J. C., HANSEN, A. G., THIEL, S. & ANDERSEN, G. R. 2017. Structure and activation of C1, the complex initiating the classical pathway of the complement cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- MOURA ROSA, P., GOPALAKRISHNAN, N., IBRAHIM, H., HAUG, M. & HALAAS, O. 2016. The intercell dynamics of T cells and dendritic cells in a lymph node-on-a-chip flow device. *Lab Chip*, 16, 3728-40.
- MOURI, Y., NISHIJIMA, H., KAWANO, H., HIROTA, F., SAKAGUCHI, N., MORIMOTO, J. & MATSUMOTO, M. 2014. NF-kappa B-Inducing Kinase in Thymic Stroma Establishes Central Tolerance by Orchestrating Cross-Talk with Not Only Thymocytes but Also Dendritic Cells. *Journal of Immunology*, 193, 4356-4367.
- MUKHOPADHYAY, S., VARMA, S., MOHAN KUMAR, H. N., YUSAF, J., GOYAL, M., MEHTA, V. & TYAGI, S. 2016. Circulating level of regulatory T cells in rheumatic heart disease: An observational study. *Indian Heart J*, 68, 342-8.
- NAGATA, K., ASANO, T., NOZAWA, Y. & INAGAKI, M. 2004. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *J Biol Chem*, 279, 55895-904.
- NAKAHIRA, M., MACEDO, J. N., SERAPHIM, T. V., CAVALCANTE, N., SOUZA, T. A., DAMALIO, J. C., REYES, L. F., ASSMANN, E. M., ALBORGHETTI, M. R., GARRATT, R. C., ARAUJO, A. P., ZANCHIN, N. I., BARBOSA, J. A. & KOBARG, J. 2010. A draft of the human septin interactome. *PLoS One*, 5, e13799.
- NASCIMBENI, M., SHIN, E. C., CHIRIBOGA, L., KLEINER, D. E. & REHERMANN, B. 2004. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*, 104, 478-86.
- NAVARRO, P., KUHAREV, J., GILLET, L. C., BERNHARDT, O. M., MACLEAN, B., ROST, H. L., TATE, S. A., TSOU, C. C., REITER, L., DISTLER, U., ROSENBERGER, G., PEREZ-RIVEROL, Y., NESVIZHISKII, A. I., AEBERSOLD, R. & TENZER, S. 2016. A multicenter study benchmarks software tools for label-free proteome quantification. *Nat Biotechnol*, 34, 1130-1136.
- NEWSON, J., STABLES, M., KARRA, E., ARCE-VARGAS, F., QUEZADA, S., MOTWANI, M., MACK, M., YONA, S., AUDZEVICH, T. & GILROY, D. W. 2014. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*, 124, 1748-64.
- NIAN, H., LIANG, D., ZUO, A., WEI, R., SHAO, H., BORN, W. K., KAPLAN, H. J. & SUN, D. 2012. Characterization of autoreactive and bystander IL-17+ T cells induced in immunized C57BL/6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 897-905.

- NIEDERKORN, J. Y. & STREILEIN, J. W. 1982. Induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) by allogeneic intraocular tumors does not require splenic metastases. *J Immunol*, 128, 2470-4.
- NIESWANDT, B., MOSER, M., PLEINES, I., VARGA-SZABO, D., MONKLEY, S., CRITCHLEY, D. & FASSLER, R. 2007. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 204, 3113-8.
- NUDELMAN, R., GLOUKHIKH, E., REKUN, A. & RICHTER, S. 2016. Investigation of the pH-dependence of dye-doped protein-protein interactions. *Protein Sci*, 25, 1918-1923.
- OLDSTONE, M. B. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*, 50, 819-20.
- OLDSTONE, M. B. 1998. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J*, 12, 1255-65.
- PALESTINE, A. G., MC ALLISTER, C., CARTER, C., KEENAN, A. M., VISTICA, B., GERY, I., DAVEY, R. & NUSSENBLATT, R. 1986. Lymphocyte migration in the adoptive transfer of EAU. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 27, 611-5.
- PAUL, D., KUMAR, A., GAJBHIYE, A., SANTRA, M. K. & SRIKANTH, R. 2013. Mass spectrometry-based proteomics in molecular diagnostics: discovery of cancer biomarkers using tissue culture. *Biomed Res Int*, 2013, 783131.
- PENG, Y., HAN, G., SHAO, H., WANG, Y., KAPLAN, H. J. & SUN, D. 2007. Characterization of IL-17+ interphotoreceptor retinoid-binding protein-specific T cells in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 4153-61.
- PERKINS, S. J., OKEMEFUNA, A. I. & NAN, R. 2010. Unravelling protein-protein interactions between complement factor H and C-reactive protein using a multidisciplinary strategy. *Biochem Soc Trans*, 38, 894-900.
- QIN, T., AN, Y., LIU, C., WU, J., DAI, R., LIU, D., LI, X., JIANG, L., WU, D., TANG, X., SONG, W., WANG, T. & ZHAO, X. 2016. Novel DOCK8 gene mutations lead to absence of protein expression in patients with hyper-IgE syndrome. *Immunol Res*, 64, 260-71.
- QUINTANA, F. J., PATEL, B., YESTE, A., NYIRENDA, M., KENISON, J., RAHBARI, R., FETCO, D., HUSSAIN, M., O'MAHONY, J., MAGALHAES, S., MCGOWAN, M., JOHNSON, T., RAJASEKHARAN, S., NARAYANAN, S., ARNOLD, D. L., WEINER, H. L., BANWELL, B., BAR-OR, A. & CANADIAN PEDIATRIC DEMYELINATING DISEASE, N. 2014. Epitope spreading as an early pathogenic event in pediatric multiple sclerosis. *Neurology*, 83, 2219-26.

- RANDALL, K. L., CHAN, S. S., MA, C. S., FUNG, I., MEI, Y., YABAS, M., TAN, A., ARKWRIGHT, P. D., AL SUWAIRI, W., LUGO REYES, S. O., YAMAZAKI-NAKASHIMADA, M. A., GARCIA-CRUZ MDE, L., SMART, J. M., PICARD, C., OKADA, S., JOUANGUY, E., CASANOVA, J. L., LAMBE, T., CORNALL, R. J., RUSSELL, S., OLIARO, J., TANGYE, S. G., BERTRAM, E. M. & GOODNOW, C. C. 2011. DOCK8 deficiency impairs CD8 T cell survival and function in humans and mice. *J Exp Med*, 208, 2305-20.
- RANDALL, K. L., LAMBE, T., JOHNSON, A. L., TREANOR, B., KUCHARSKA, E., DOMASCHENZ, H., WHITTLE, B., TZE, L. E., ENDERS, A., CROCKFORD, T. L., BOURIEZ-JONES, T., ALSTON, D., CYSTER, J. G., LENARDO, M. J., MACKAY, F., DEENICK, E. K., TANGYE, S. G., CHAN, T. D., CAMIDGE, T., BRINK, R., VINUESA, C. G., BATISTA, F. D., CORNALL, R. J. & GOODNOW, C. C. 2009. Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. *Nat Immunol*, 10, 1283-91.
- REBHUN, W. C. 1979. Diagnosis and treatment of equine uveitis. *J Am Vet Med Assoc*, 175, 803-8.
- REGAN, D. P., AARNIO, M. C., DAVIS, W. S., CARMICHAEL, K. P., VANDENPLAS, M. L., LAUDERDALE, J. D. & MOORE, P. A. 2012. Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*, 15, 145-52.
- REN, L., EMERY, D., KABOORD, B., CHANG, E. & QORONFLEH, M. W. 2003. Improved immunomatrix methods to detect protein:protein interactions. *J Biochem Biophys Methods*, 57, 143-57.
- REN, Y., ZHAO, P., LIU, J., YUAN, Y., CHENG, Q., ZUO, Y., QIAN, L., LIU, C., GUO, T., ZHANG, L., WANG, X., QIAN, G., LI, L., GE, J., DAI, J., XIONG, S. & ZHENG, H. 2016. Deubiquitinase USP2a Sustains Interferons Antiviral Activity by Restricting Ubiquitination of Activated STAT1 in the Nucleus. *PLoS Pathog*, 12, e1005764.
- RIPOLL, E., DE RAMON, L., DRAIBE BORDIGNON, J., MERINO, A., BOLANOS, N., GOMA, M., CRUZADO, J. M., GRINYO, J. M. & TORRAS, J. 2016. JAK3-STAT pathway blocking benefits in experimental lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*, 18, 134.
- ROMEIKE, A., BRUGMANN, M. & DROMMER, W. 1998. Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol*, 35, 515-26.
- RONCHI, F., BASSO, C., PREITE, S., REBOLDI, A., BAUMJOHANN, D., PERLINI, L., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2016. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1beta production by myeloid cells. *Nat Commun*, 7, 11541.

- ROZENKRANTZ, L., GAN-OR, Z., GANA-WEISZ, M., MIRELMAN, A., GILADI, N., BAR-SHIRA, A. & ORR-URTREGER, A. 2016. SEPT14 Is Associated with a Reduced Risk for Parkinson's Disease and Expressed in Human Brain. *J Mol Neurosci*, 59, 343-50.
- RUUSALA, A. & ASPENSTROM, P. 2004. Isolation and characterisation of DOCK8, a member of the DOCK180-related regulators of cell morphology. *FEBS Lett*, 572, 159-66.
- SADIAN, Y., GATSOGIANNIS, C., PATASI, C., HOFNAGEL, O., GOODY, R. S., FARKASOVSKY, M. & RAUNSER, S. 2013. The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation. *Elife*, 2, e01085.
- SALINOVICH, O. & MONTELARO, R. C. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 156, 341-7.
- SANDBERG, A., BRANCA, R. M., LEHTIO, J. & FORSHED, J. 2014. Quantitative accuracy in mass spectrometry based proteomics of complex samples: the impact of labeling and precursor interference. *J Proteomics*, 96, 133-44.
- SANDERSON, N. S., ZIMMERMANN, M., EILINGER, L., GUBSER, C., SCHAEREN-WIEMERS, N., LINDBERG, R. L., DOUGAN, S. K., PLOEGH, H. L., KAPPOS, L. & DERFUSS, T. 2017. Cocapture of cognate and bystander antigens can activate autoreactive B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 734-739.
- SATO, S. & KEFALOV, V. J. 2016. cis Retinol oxidation regulates photoreceptor access to the retina visual cycle and cone pigment regeneration. *J Physiol*, 594, 6753-6765.
- SCHEWITZ-BOWERS, L. P., LAIT, P. J., COPLAND, D. A., CHEN, P., WU, W., DHANDA, A. D., VISTICA, B. P., WILLIAMS, E. L., LIU, B., JAWAD, S., LI, Z., TUCKER, W., HIRANI, S., WAKABAYASHI, Y., ZHU, J., SEN, N., CONWAY-CAMPBELL, B. L., GERY, I., DICK, A. D., WEI, L., NUSSENBLATT, R. B. & LEE, R. W. 2015. Glucocorticoid-resistant Th17 cells are selectively attenuated by cyclosporine A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 4080-5.
- SCHLAGER, C., KORNER, H., KRUEGER, M., VIDOLI, S., HABERL, M., MIELKE, D., BRYLLA, E., ISSEKUTZ, T., CABANAS, C., NELSON, P. J., ZIEMSEN, T., ROHDE, V., BECHMANN, I., LODYGIN, D., ODOARDI, F. & FLUGEL, A. 2016. Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid. *Nature*, 530, 349-53.
- SCHMIDT, A., ELIAS, S., JOSHI, R. N. & TEGNER, J. 2016. In Vitro Differentiation of Human CD4+FOXP3+ Induced Regulatory T Cells (iTregs) from Naive CD4+ T Cells Using a TGF-beta-containing Protocol. *J Vis Exp*.

- SCHNABEL, L. V., PAPICH, M. G., DIVERS, T. J., ALTIER, C., APREA, M. S., MCCARREL, T. M. & FORTIER, L. A. 2012. Pharmacokinetics and distribution of minocycline in mature horses after oral administration of multiple doses and comparison with minimum inhibitory concentrations. *Equine Vet J*, 44, 453-8.
- SCHWINK, K. L. 1992. Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 8, 557-74.
- SCIELZO, C., BERTILACCIO, M. T., SIMONETTI, G., DAGKLIS, A., TEN HACKEN, E., FAZI, C., MUZIO, M., CAIOLFA, V., KITAMURA, D., RESTUCCIA, U., BACHI, A., ROCCHI, M., PONZONI, M., GHIA, P. & CALIGARIS-CAPPIO, F. 2010. HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood*, 116, 3537-46.
- SERRAO, V. H., ALESSANDRO, F., CALDAS, V. E., MARCAL, R. L., PEREIRA, H. D., THIEMANN, O. H. & GARRATT, R. C. 2011. Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. *FEBS Lett*, 585, 3868-73.
- SEUMOIS, G., ZAPARDIEL-GONZALO, J., WHITE, B., SINGH, D., SCHULTEN, V., DILLON, M., HINZ, D., BROIDE, D. H., SETTE, A., PETERS, B. & VIJAYANAND, P. 2016. Transcriptional Profiling of Th2 Cells Identifies Pathogenic Features Associated with Asthma. *J Immunol*, 197, 655-64.
- SHAO, H., LIAO, T., KE, Y., SHI, H., KAPLAN, H. J. & SUN, D. 2006. Severe chronic experimental autoimmune uveitis (EAU) of the C57BL/6 mouse induced by adoptive transfer of IRBP1-20-specific T cells. *Exp Eye Res*, 82, 323-31.
- SHEN, L., GAO, C., SURESH, L., XIAN, Z., SONG, N., CHAVES, L. D., YU, M. & AMBRUS, J. L., JR. 2016. Central role for marginal zone B cells in an animal model of Sjogren's syndrome. *Clin Immunol*, 168, 30-6.
- SHIRAISHI, A., URUNO, T., SANEMATSU, F., USHIJIMA, M., SAKATA, D., HARA, T. & FUKUI, Y. 2016. DOCK8 Regulates Macrophage Migration through Cdc42 Activation and LRAP35a Interaction. *J Biol Chem*.
- SIMEONOVA, G. P., KRASSTEV, S. Z. & SIMEONOV, R. S. 2016. Immunological and pathological investigations in equine experimental uveitis. *Vet Res Commun*, 40, 107-115.
- SMITH, G. A., UCHIDA, K., WEISS, A. & TAUNTON, J. 2016. Essential biphasic role for JAK3 catalytic activity in IL-2 receptor signaling. *Nat Chem Biol*, 12, 373-9.
- SOARES, M. P., TEIXEIRA, L. & MOITA, L. F. 2017. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nat Rev Immunol*, 17, 83-96.
- SPIESS, B. M. 1997. [Equine recurrent uveitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 139, 126-33.
- SPIESS, B. M. 2010. Equine recurrent uveitis: the European viewpoint. *Equine Vet J Suppl*, 50-6.

- SPILIOTIS, E. T., KINOSHITA, M. & NELSON, W. J. 2005. A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science*, 307, 1781-5.
- STANIC, B., VAN DE VEEN, W., WIRZ, O. F., RUCKERT, B., MORITA, H., SOLLNER, S., AKDIS, C. A. & AKDIS, M. 2015. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol*, 135, 771-80 e8.
- STONE, J. C. 2011. Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer*, 2, 320-34.
- STREILEIN, J. W. & NIEDERKORN, J. Y. 1981. Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med*, 153, 1058-67.
- STREILEIN, J. W. & NIEDERKORN, J. Y. 1985. Characterization of the suppressor cell(s) responsible for anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced in BALB/c mice by P815 cells. *J Immunol*, 134, 1381-7.
- STROBEL, B. W., WILKIE, D. A. & GILGER, B. C. 2007. Retinal detachment in horses: 40 cases (1998-2005). *Vet Ophthalmol*, 10, 380-5.
- STUMHOFER, J. S., LAURENCE, A., WILSON, E. H., HUANG, E., TATO, C. M., JOHNSON, L. M., VILLARINO, A. V., HUANG, Q., YOSHIMURA, A., SEHY, D., SARIS, C. J., O'SHEA, J. J., HENNIGHAUSEN, L., ERNST, M. & HUNTER, C. A. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol*, 7, 937-45.
- SZOBER, C. M., HAUCK, S. M., EULER, K. N., FROHLICH, K. J., ALGE-PRIGLINGER, C., UEFFING, M. & DEEG, C. A. 2012. Profound re-organization of cell surface proteome in equine retinal pigment epithelial cells in response to in vitro culturing. *Int J Mol Sci*, 13, 14053-72.
- TADOKORO, S., SHATTIL, S. J., ETO, K., TAI, V., LIDDINGTON, R. C., DE PEREDA, J. M., GINSBERG, M. H. & CALDERWOOD, D. A. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 302, 103-6.
- TAKINO, J., NAGAMINE, K. & HORI, T. 2013. Ras guanyl nucleotide releasing protein 2 affects cell viability and cell-matrix adhesion in ECV304 endothelial cells. *Cell Adh Migr*, 7, 262-6.
- TANGYE, S. G., PILLAY, B., RANDALL, K. L., AVERY, D. T., PHAN, T. G., GRAY, P., ZIEGLER, J. B., SMART, J. M., PEAKE, J., ARKWRIGHT, P. D., HAMBLETON, S., ORANGE, J., GOODNOW, C. C., UZEL, G., CASANOVA, J. L., LUGO REYES, S. O., FREEMAN, A. F., SU, H. C. & MA, C. S. 2016. Dedicator of cytokinesis 8-deficient CD4+ T cells are biased to a TH2 effector fate at the expense of TH1 and TH17 cells. *J Allergy Clin Immunol*.

- TEO, Z. L., MCQUEEN-MISCAMBLE, L., TURNER, K., MARTINEZ, G., MADAKASHIRA, B., DEDHAR, S., ROBINSON, M. L. & DE IONGH, R. U. 2014. Integrin linked kinase (ILK) is required for lens epithelial cell survival, proliferation and differentiation. *Exp Eye Res*, 121, 130-42.
- THOMPSON, L. J., LAI, J. F., VALLADAO, A. C., THELEN, T. D., URRY, Z. L. & ZIEGLER, S. F. 2016. Conditioning of naive CD4(+) T cells for enhanced peripheral Foxp3 induction by nonspecific bystander inflammation. *Nat Immunol*, 17, 297-303.
- TOOLEY, A. J., GILDEN, J., JACOBELLI, J., BEEMILLER, P., TRIMBLE, W. S., KINOSHITA, M. & KRUMMEL, M. F. 2009. Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat Cell Biol*, 11, 17-26.
- TORII, H., YOSHIDA, A., KATSUNO, T., NAKAGAWA, T., ITO, J., OMORI, K., KINOSHITA, M. & YAMAMOTO, N. 2016. Septin7 regulates inner ear formation at an early developmental stage. *Dev Biol*, 419, 217-228.
- UHL, P. B., SZOBER, C. M., AMANN, B., ALGE-PRIGLINGER, C., UEFFING, M., HAUCK, S. M. & DEEG, C. A. 2014. In situ cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis. *J Proteomics*, 109, 50-62.
- URUNO, T., ZHANG, P., LIU, J., HAO, J. J. & ZHAN, X. 2003. Haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) promotes actin-related protein (Arp) 2/3 complex-mediated actin polymerization. *Biochem J*, 371, 485-93.
- USTARROZ-CANO, M., GARCIA-PELAEZ, I., CERVANTES-YEPEZ, S., LOPEZ-VALDEZ, N. & FORTOUL, T. I. 2017. Thymic cytoarchitecture changes in mice exposed to vanadium. *J Immunotoxicol*, 14, 9-14.
- VANDERLUGT, C. J. & MILLER, S. D. 1996. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol*, 8, 831-6.
- VEERAPPAN, M., FLEISCHMAN, D., ULRICH, J. N., STINNETT, S. S., JAFFE, G. J. & ALLINGHAM, R. R. 2016. The Relationship of Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome to Ocular Hypertension and Glaucoma. *Ocul Immunol Inflamm*, 1-5.
- VIGIL, D., CHERFILS, J., ROSSMAN, K. L. & DER, C. J. 2010. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, 10, 842-57.
- VON BORSTEL, M., VON OPPEN, T., GLITZ, F., FRUEHAUF, B., DEEGEN, E., BOEV'E, M. H. & OHNESORGE, B. 2005. Long-term results of pars-plana (double-port) vitrectomy in equine recurrent Uveitis. *Pferdeheilkunde* 21, 13-18.
- WACKER, W. B., DONOSO, L. A., KALSOW, C. M., YANKEELOV, J. A., JR. & ORGANISCIAK, D. T. 1977. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol*, 119, 1949-58.

-
- WACKER, W. B. & LIPTON, M. M. 1965. Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature*, 206, 253-4.
- WAGNER, B., BURTON, A. & AINSWORTH, D. 2010. Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet Res*, 41, 47.
- WANG, H., YANG, Y., LI, Y., BAI, B., WANG, X., TAN, H., LIU, T., BEACH, T. G., PENG, J. & WU, Z. 2015. Systematic optimization of long gradient chromatography mass spectrometry for deep analysis of brain proteome. *J Proteome Res*, 14, 829-38.
- WANG, H. X., QIU, Y. R. & ZHONG, X. P. 2016a. Intercellular Protein Transfer from Thymocytes to Thymic Epithelial Cells. *Plos One*, 11.
- WANG, Y., ZHANG, Z., ZHANG, L., LI, X., LU, R., XU, P., ZHANG, X., DAI, M., DAI, X., QU, J., LU, F. & CHI, Z. 2016b. S100A8 promotes migration and infiltration of inflammatory cells in acute anterior uveitis. *Sci Rep*, 6, 36140.
- WASIK, A. A., DUMONT, V., TIENARI, J., NYMAN, T. A., FOGARTY, C. L., FORSBLOM, C., LEHTO, M., LEHTONEN, E., GROOP, P. H. & LEHTONEN, S. 2017. Septin 7 reduces nonmuscle myosin IIA activity in the SNAP23 complex and hinders GLUT4 storage vesicle docking and fusion. *Exp Cell Res*, 350, 336-348.
- WASIK, A. A., POLIANSKYTE-PRAUSE, Z., DONG, M. Q., SHAW, A. S., YATES, J. R., 3RD, FARQUHAR, M. G. & LEHTONEN, S. 2012. Septin 7 forms a complex with CD2AP and nephrin and regulates glucose transporter trafficking. *Mol Biol Cell*, 23, 3370-9.
- WERRY, H. & GERHARDS, H. 1992. [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax*, 20, 178-86.
- WILKINS, M. R., PASQUALI, C., APPEL, R. D., OU, K., GOLAZ, O., SANCHEZ, J. C., YAN, J. X., GOOLEY, A. A., HUGHES, G., HUMPHERY-SMITH, I., WILLIAMS, K. L. & HOCHSTRASSER, D. F. 1996a. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 14, 61-5.
- WILKINS, M. R., SANCHEZ, J. C., GOOLEY, A. A., APPEL, R. D., HUMPHERY-SMITH, I., HOCHSTRASSER, D. F. & WILLIAMS, K. L. 1996b. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13, 19-50.
- WU, C. C. & CHEN, B. S. 2016. A Systems Biology Approach to the Coordination of Defensive and Offensive Molecular Mechanisms in the Innate and Adaptive Host-Pathogen Interaction Networks. *PLoS One*, 11, e0149303.

- WU, X., CHAVEZ, J. D., SCHWEPPE, D. K., ZHENG, C., WEISBROD, C. R., ENG, J. K., MURALI, A., LEE, S. A., RAMAGE, E., GALLAGHER, L. A., KULASEKARA, H. D., EDROZO, M. E., KAMISCHKE, C. N., BRITTNACHER, M. J., MILLER, S. I., SINGH, P. K., MANOIL, C. & BRUCE, J. E. 2016. In vivo protein interaction network analysis reveals porin-localized antibiotic inactivation in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Nat Commun*, 7, 13414.
- XING, Y., WANG, X., JAMESON, S. C. & HOGQUIST, K. A. 2016. Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF-kappaB and tonic type I interferon signaling. *Nat Immunol*, 17, 565-73.
- XU, X., HAN, L., ZHAO, G., XUE, S., GAO, Y., XIAO, J., ZHANG, S., CHEN, P., WU, Z. Y., DING, J., HU, R., WEI, B. & WANG, H. 2017. LRCH1 interferes with DOCK8-Cdc42-induced T cell migration and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 214, 209-226.
- YAMAMURA, K., URUNO, T., SHIRAISHI, A., TANAKA, Y., USHIJIMA, M., NAKAHARA, T., WATANABE, M., KIDO-NAKAHARA, M., TSUGE, I., FURUE, M. & FUKUI, Y. 2017. The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. *Nat Commun*, 8, 13946.
- YAMANASHI, Y., OKADA, M., SEMBA, T., YAMORI, T., UMEMORI, H., TSUNASAWA, S., TOYOSHIMA, K., KITAMURA, D., WATANABE, T. & YAMAMOTO, T. 1993. Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 3631-5.
- YLIKOSKI, E., LUND, R., KYLANIEMI, M., FILEN, S., KILPELAINEN, M., SAVOLAINEN, J. & LAHESMAA, R. 2005. IL-12 up-regulates T-bet independently of IFN-gamma in human CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 35, 3297-306.
- ZHANG, N., LIU, L., FAN, N., ZHANG, Q., WANG, W., ZHENG, M., MA, L., LI, Y. & SHI, L. 2016. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation. *Oncotarget*, 7, 61587-61600.
- ZHANG, Q., DAVIS, J. C., LAMBORN, I. T., FREEMAN, A. F., JING, H., FAVREAU, A. J., MATTHEWS, H. F., DAVIS, J., TURNER, M. L., UZEL, G., HOLLAND, S. M. & SU, H. C. 2009. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N Engl J Med*, 361, 2046-55.
- ZHANG, Q., DOVE, C. G., HOR, J. L., MURDOCK, H. M., STRAUSS-ALBEE, D. M., GARCIA, J. A., MANDL, J. N., GRODICK, R. A., JING, H., CHANDLER-BROWN, D. B., LENARDO, T. E., CRAWFORD, G., MATTHEWS, H. F., FREEMAN, A. F., CORNALL, R. J., GERMAIN, R. N., MUELLER, S. N. & SU, H. C. 2014. DOCK8 regulates lymphocyte shape integrity for skin antiviral immunity. *J Exp Med*, 211, 2549-66.

ZHANG, W., ZHONG, T. & CHEN, Y. 2017. LC-MS/MS-based targeted proteomics quantitatively detects the interaction between p53 and MDM2 in breast cancer. *J Proteomics*, 152, 172-180.

ZHOU, R. & CASPI, R. R. 2010. Ocular immune privilege. *F1000 Biol Rep*, 2.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Deeg, für die Bereitstellung des überaus interessanten und vielseitigen Themas und ihre außerordentlich engagierte Betreuung meiner Arbeit. Trotz eines vollen Terminkalenders stand sie mir rund um die Uhr mit ihrer großartigen fachlichen Kompetenz zur Seite. Durch ihre professionelle und persönliche Unterstützung hat sie meine Begeisterung an der wissenschaftlichen Arbeit geweckt.

Für den am Institut für Tierphysiologie zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Göbel und Herrn Prof. Dr. Erhard.

Bei Frau Dr. Hauck aus dem Helmholtz Zentrum München möchte ich mich sehr herzlich für ihre Hilfe bei proteomischen und massenspektrometrischen Fragestellungen sowie für ihre wertvollen Anregungen bei den Korrekturen dieser Arbeit bedanken.

Auch bei dem gesamten Team der Research Unit Protein Science des Deutschen Forschungszentrums für Gesundheit und Umwelt bedanke ich mich für die stets freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Göhring und Herrn Prof. Dr. Gerhards danke ich herzlich für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten Blutproben. Bei dem gesamten Team der Klinik für Pferde möchte ich mich für die Einsatzbereitschaft und freundliche Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt insbesondere Frau Dr. Witte, die für eine Blutprobenentnahme jederzeit alle Hebel in Bewegung gesetzt hat.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Barbara Amann und Sieglinde Hirmer bedanken. Durch ihre langjährige Erfahrung konnten sie mir bei technischen Fragestellungen und Problemen jeder Art behilflich sein. Die liebevollen Worte und tatkräftige Unterstützung waren eine große Bereicherung über die gesamte Zeit.

Mein riesiger Dank gilt meinen Arbeitskolleginnen Dr. Roxane Degroote, Dr. Kristina Kleinwort und Dr. Karina Lutterberg. Ich habe mich in unserem kleinen Team sehr wohl gefühlt und bin froh, in euch so tolle Kolleginnen und Freundinnen gefunden zu haben. Ich konnte mich in jeder noch so ausweglosen Situation auf eure Hilfe und Unterstützung verlassen. Ihr habt die Zeit durch lustige Gespräche, obligatorische „Kaffee?“-Pausen und Krapfenstudien zu einem ganz besonderen Abschnitt in meinem Leben gemacht. Dr. Karina Lutterberg möchte ich vor allem für ihre Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen danken. Du hast mir in vielen Situationen zur Seite gestanden und mich mit Rat und Tat unterstützt. Dr. Roxane Degroote möchte ich ganz besonders für ihre hilfreichen Korrekturen und Anmerkungen zu dieser Arbeit danken. Deine außerordentliche Einsatzbereitschaft und aufbauenden Worte weiß ich sehr zu schätzen. Mein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Sitznachbarin Dr. Kristina Kleinwort. Du hattest stets ein offenes Ohr für all meine Probleme fachlicher und persönlicher Art und hast immer eine Lösung gefunden. An deinem großen Glück teilhaben zu dürfen, war für mich ganz wunderbar und ich wünsche dir und deiner kleinen Familie alles Liebe.

Meinen Freundinnen Anna Kramer, Daniela Kaubisch und Christina Schießl möchte ich ganz herzlich für ihre Unterstützung danken. Durch aufmunternde Worte, bunte Postkarten und Nervennahrung habt ihr mir stets unter die Arme gegriffen. Ihr seid etwas ganz Besonderes.

Anschließend gilt mein besonderer Dank meiner Familie. Ohne euch alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vor allem danke ich meinen Eltern, Herr Dr. Gerhard Schauer und Frau Dr. Heidi Wichmann-Schauer, für ihre liebevolle Unterstützung. Ihr habt mir stets den Rücken gestärkt und aus jeder sauren Zitrone Limonade gemacht. Auch meinem Bruder Tim Schauer danke ich herzlich für die Motivationsschübe, die er in mir auslösen konnte. Du bist der Beste. Meinen lieben Großeltern danke ich für ihre langjährig entgegengebrachte Unterstützung. Besonders meinem bereits verstorbenen Opa Helmut gilt mein besonderer Dank.

Ein riesiges Dankeschön hat mein Freund Tobias Schießl verdient. Nicht nur die lebenserhaltenden Maßnahmen in den letzten Monaten, wie das perfekte Gröstl und schmerzlindernde Nackenmassagen, haben mir immer wieder auf die Beine geholfen. Auch deine liebevolle Art, dein Humor und deine Gelassenheit machen die Zeit mit dir zu der schönsten in meinem Leben.